

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS
DE 30 PLANTAS RECOLECTADAS EN LA ECOREGION CAFETERA**

JENNIFER TOVAR DEL RIO

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**

PEREIRA

2013

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS
DE 30 PLANTAS RECOLECTADAS EN LA ECOREGION CAFETERA**

JENNIFER TOVAR DEL RIO

CÓDIGO: 1088277675

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial

DIRECTOR DEL PROYECTO

OSCAR MARINO MOSQUERA.

Profesor Titular

Universidad Tecnológica de Pereira

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2013

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
AGRADECIMIENTOS	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO.....	3
2.2 PRINCIPALES FUENTES DE MECANISMOS GENERADORES DE ERO	4
2.2.1 ERO MAS REPRESENTATIVAS	6
2.2.1.1 Especies radicalarias	6
2.2.1.2 Especies no radicalarias	6
2.3 TOXICIDAD CELULAR DE LAS ERO (Blancos principales).....	6
2.3.1 Interacción con el ADN	7
2.3.2 Interacción con las proteínas	7
2.3.3 Interacción con los lípidos.....	7
2.4 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	7
2.4.1 Antioxidantes primarios	7
2.4.2 Antioxidantes secundarios	10
2.4.2.1 Sustancias endógenas con capacidad antioxidantes	11
2.4.3 Antioxidantes terciarios.....	12
2.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	13
2.5.1 Medición de la actividad antioxidante	13

2.5.2 Ensayo DPPH* (1,1-difeneil-2-picril-hidrazilo)	15
2.5.3 Ensayo ABTS** (Acido2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonico))17	
2.6 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES POR EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU	18
2.7 IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES	20
2.7.1Determinación e identificación de flavonoides	21
2.7.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21
2.7.1.2 Cromatografía líquida -UV	22
2.8 CARACTERÍSTICAS DE LAS FAMILIAS DE PLANTAS A ESTUDIAR ..	24
2.8.1Familia Apiaceae	25
2.8.2 Familia Apocynaceae	26
2.8.3 Familia Clusiaceae	26
2.8.4 Familia Euphorbiaceae	27
2.8.5 Familia Melastomataceae	27
2.8.6 Familia Passifloraceae	28
2.8.7 Familia Piperaceae	28
2.8.8 Familia Rubiaceae.....	29
2.8.9 Familia Solanaceae	29
3. JUSTIFICACION	31
4. OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GENERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. METODOLOGÍA	34
5.1 MATERIALES	34
5.1.1 Reactivos	34
5.1.2 Materiales y equipos	34
5.1.3 Material vegetal	35
5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	35

5.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DPPH*	37
5.3.1 Preparación del DPPH*	37
5.3.2 Capacidad captadora del radical DPPH* (1,1 difenil-2-picrilhidrazilo)	37
5.3.3 Capacidad Capacidad antioxidante en equivalentes trolox	40
5.4 ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL RADICAL CATIÓN DEL ÁCIDO 2,2' - AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA)-6 SULFÓNICO ABTS**	40
5.4.1 Generación de radical catión ABTS**	40
5.4.2 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS**	40
5.5 DETERMINCIÓN DE FENOLES TOTALES	43
5.6.IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES ESPECTOFOTOMETRICAMENTE	44
5.6.1 Determinación de flavonoides totales	44
5.6.2 Separación e identificación de flavonoides por HPLC	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS VEGETALES	48
6.1.1 Ensayo DPPH	48
6.1.1.1 Condiciones preliminares	48
6.1.1.2 Determinación de los porcentajes de actividad antioxidante por el ensayo DPPH	48
6.1.1.3 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC ₅₀)	51
6.1.2 Ensayo ABTS**	56
6.1.2.1 Condiciones preliminares	56
6.1.2.2 Determinación de los porcentajes de actividad antioxidante por el ensayo ABTS**	57
6.2 DETERMINACIÓN DE EQUIVALENTES TROLOX	59
6.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	66
6.4 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	70

6.5 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR HPLC-DAD Y ESPECTROSCOPIA UV-VIS	75
6.5.1 Separación de flavonoides por HPLC de los extractos crudos en estudio .	75
7. CONCLUSIONES	89
8. RECOMENDACIONES	90
9. BIBLIOGRAFIA	91
ANEXOS	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT.....	14
Tabla 2. Clasificación de los flavonoides según sus espectros UV.....	23
Tabla 3. Plantas recolectadas en las diferentes zonas de reserva de la región.....	36
Tabla 4. Volúmenes de dilución de los extractos a partir de la solución stock.....	37
Tabla 5. Porcentaje de actividad antioxidante por el ensayo DPPH [•] , de los extractos de metanol activos y su respectivo IC ₅₀	53
Tabla 6. Porcentaje de actividad antioxidante por el ensayo DPPH [•] , de los extractos de diclorometano activos y su respectivo IC ₅₀	54
Tabla 7. Porcentaje de actividad antioxidante por el ensayo ABTS ^{•+} , de los extractos de metanol activos y su respectivo IC ₅₀	57
Tabla 8. Porcentaje de actividad antioxidante por el ensayo DPPH [•] , de los extractos de diclorometano activos y su respectivo IC ₅₀	59
Tabla 9. Porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones trolox...	60
Tabla 10. Porcentajes de actividad antioxidante de los extractos de metanol activos y su concentración en equivalentes trolox por los métodos de DPPH [•] y ABTS ^{•+}	62
Tabla 11. Porcentajes de actividad antioxidante de los extractos de diclorometano activos y su concentración en equivalentes trolox por los métodos de DPPH [•] y ABTS ^{•+}	64
Tabla 12. Contenido de fenoles totales (F-C) de los extractos de metanol activos...	67
Tabla 13. Contenido de fenoles totales (F-C) de los extractos de diclorometano activos.....	69

Tabla 14. Contenido de flavonoides totales de los extractos de metanol activos expresados en equivalente de kaempferol.....	71
Tabla 15. Contenido de flavonoides totales de los extractos de diclorometano activos expresados en equivalente de kaempferol.....	74
Tabla 16. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para diferentes estándares de flavonoides y las longitudes de onda de sus respectivos espectros UV con un sistema (metano-acido fórmico al 1%).....	78
Tabla 17. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para el extracto de metanol de <i>Clusia Multiflora</i> (UTP 157) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV.....	80
Tabla 18. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para el extracto de diclorometano de <i>Clusia Multiflora</i> (UTP 157) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV.....	83
Tabla 19. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para el extracto de metanol de <i>Tovomita guianensis</i> (UTP 159) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV.....	85
Tabla 20. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para el extracto de diclorometano de <i>Tovomita guianensis</i> (UTP 159) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV.....	86
Tabla 21. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para el extracto de metanol de <i>Topobe cf discolor</i> (UTP 160) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV.....	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones (referencia).....	4
Figura 2. Producción del anión radical superóxido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial (referencia).....	5
Figura 3. Reacciones de Haber-Weiss y Fenton (referencia).....	5
Figura 4. Vías de peroxidación lipídica (Marnett 1999).....	8
Figura 5. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de mecanismos de defensa humanos.....	10
Figura 6. Reacción de tocoferol para formar el radical peroxil (webster, 1999).....	11
Figura 7. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Huang et al., 2005).....	15
Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alan et al., 2012).....	16
Figura 9. Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009).....	18
Figura 10. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005).....	19
Figura 11. Estructuras químicas de los diferentes flavonoides (Samprieto et al., 2009).....	20
Figura 12. Perfil cromatográfico (por HPLC) de 28 diferentes polifenoles en una columna C ₁₈ . (Andersen et al., 2006).....	22
Figura 13. Estructura general de los flavonoides (Heim et al., 2002).....	23
Figura 14. Protocolo para la preparación de los extractos a diferentes concentraciones.....	35
Figura 15. Método para la evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH [•] (Murillo et al., 2007).....	38

Figura 16. Ecuación para calcular el porcentaje de actividad antioxidante de los extractos para el ensayo DPPH [•]	39
Figura 17. Protocolo para la generación del radical catión ABTS ^{•+} (Re et al., 2009).....	41
Figura 18. Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS (Mathew et al., 2005).....	42
Figura 19. Protocolo para la determinación de fenoles totales en las muestras de extractos vegetales (Magalhaes et al., 2010).....	44
Figura 20. Protocolo para la determinación de flavonoides totales en las muestras de extractos vegetales (Kim et al., 2003).....	45
Figura 21. Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos de metanol de las 30 planta evaluadas por el ensayo DPPH [•]	49
Figura 22. Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos de diclorometano de las 30 plantas evaluadas por el ensayo DPPH [•]	51
Figura 23. Porcentajes de actividad antioxidante de los extractos de metanol y diclorometano de las 30 plantas en estudio subdividida por familias (A: Apocynaceae, B: Asclepidiaceae, C: Clusiaceae, D: Euphorbiaceae, E: Melastomataceae, F: Passifloraceae, G: Pipperaceae, H: Rubiaceae, I: Solanaceae).....	52
Figura 24. Estructura del ABTS y ABTS ^{•+} radical catión (Osman et al., 2006).....	56
Figura 25. Curva de calibración trolox para el ensayo DPPH [•]	61
Figura 26. Correlación entre los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos mediante los ensayos DPPH [•] y ABTS ^{•+} para los extractos de metanol.....	63
Figura 27. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de los fenoles totales de los extractos vegetales.....	66

Figura 28. Contenido total de fenoles para los extractos de metanol y diclorometano.....	69
Figura 29. Curva de calibración de kaempferol para la determinación del contenido de flavonoides totales.....	71
Figura 30. Contenido de flavonoides totales para los extractos de metanol y diclorometano.....	75
Figura 31. Patrones de flavonoides utilizados como referencia.....	77
Figura 32. Cromatograma de HPLC analítico del extracto de metanol de <i>Clusia Multiflora</i> (UTP 157) a una longitud de onda de 289, 330 y 350 nm. Sistema de elución gradiente 0-100% acetonitrilo-ácido fórmico CH ₃ CN-HCOOH 1%.....	79
Figura 33. Isoflavona metilada/glicosidada en la posición C ₅	81
Figura 34. Espectro UV del extracto crudo <i>Clusia multiflora</i> (UTP 157), t _R : 18,740 y longitud de onda de 280 nm.....	82
Figura 35. Espectro UV del extracto crudo <i>Tovomita guianensis</i> (UTP 159), t _R : 19,697 y longitud de onda de 280 nm.....	87

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de actividad antioxidante promedio de los extractos de metanol evaluados, obtenidos mediante el ensayo DPPH [•]	104
Anexo 2. Porcentajes de actividad antioxidante promedio de los extractos de diclorometano evaluados, obtenidos mediante el ensayo DPPH [•]	105
Anexo 3. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH [•] para los extractos de metanol activos, evaluados a diferentes concentraciones.....	106
Anexo 4. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH [•] para los extractos de diclorometano activos, evaluados a diferentes concentraciones.....	109
Anexo 5. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS ^{•+} para los extractos de metanol activos, evaluados a diferentes concentraciones.....	110
Anexo 6. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS ^{•+} para los extractos de diclorometano activos, evaluados a diferentes concentraciones.....	113
Anexo 7. Curva de calibración trolox para el ensayo ABTS ^{•+}	114
Anexo 8. Correlación entre los porcentajes de actividad antioxidante obtenido mediante el ensayo ABTS ^{•+} y DPPH [•] para los extractos de diclorometano.....	114
Anexo 9. Datos correspondientes a la construcción calibración del ácido gálico...	115
Anexo 10. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenida mediante el ensayo DPPH [•]	115
Anexo 11. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenida mediante el ensayo ABTS ^{•+}	116
Anexo 12. Curva de calibración del kaempferol.....	116

Anexo 13. Correlación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales de los extractos de metanol.....	117
Anexo 14. Correlación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales de los extractos de diclorometano.....	117
Anexo 15. Espectros UV de los estándares analizados por HPLC.....	118
Anexo 16. Espectros UV del cromatograma del extracto <i>Clusia multiflora</i> (UTP 157) de metanol a una longitud de onda de 280.....	119
Anexo 17. Cromatograma de HPLC analítico del extracto 157 de diclorometano a longitud de onda de 280, 330,350 y 380 nm. Sistema de elución 2.....	122
Anexo 18. Espectros UV del cromatograma del extracto <i>Clusia multiflora</i> (UTP 157) de diclorometano a longitud de onda de 280.....	123
Anexo 19. Cromatograma de HPLC analítico del extracto 159 de metanol a longitud de onda de 280, 330,350 y 380 nm. Sistema de elución 1.....	125
Anexo 20. Espectros UV del cromatograma del extracto <i>Tovomita Guianensis</i> (UTP 159) de metanol a longitud de 280 nm.....	126
Anexo 21. Cromatograma de HPLC analítico del extracto 159 de diclorometano a longitud de onda de 280, 330,350 y 380 nm. Sistema de elución 3.....	128
Anexo 22. Espectros UV del cromatograma del extracto <i>Tovomita Guianensis</i> (UTP 159) de diclorometano a longitud de onda de 280.....	129
Anexo 23. Cromatograma de HPLC analítico del extracto 160 de metanol a longitud de onda de 280, 330,350 y 380 nm. Sistema de elución 1.....	131
Anexo 24. Espectros UV del cromatograma del extracto <i>Topobea cf. discolor</i> (UTP 160) de diclorometano a longitud de onda de 280.....	132

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), entre otros radicales pueden generar estrés oxidativo, fenómeno al cual se le atribuyen muchas enfermedades neurodegenerativas. Se ha evidenciado que las plantas y sus constituyentes son fuente de antioxidantes; por tanto, tienen la capacidad de capturar EROs. En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos crudos de metanol y diclorometano de 30 plantas pertenecientes a 8 diferentes familias y caracterizar por medio de un perfil cromatográfico el tipo de flavonoides presentes en dichos extractos.

Las plantas fueron recolectadas en la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC); se les realizó una extracción a la parte aérea por maceración pasiva y se evaluó su actividad antioxidante por medio de dos modelos *in vitro*, DPPH y ABTS; usando como estándar o control positivo Hidroquinona. Además, se determinó el perfil cromatográfico de flavonoides por HPLC de aquellos extractos que presentaron una actividad antioxidante mayor al 25%, utilizando una columna Hypersil C₁₈, 4 µm, 4.6 x 50 mm, un detector DAD y un sistema en gradiente que posteriormente permitiría la identificación del tipo de flavonoides presentes a través del espectro UV.

El 50% de los extractos de metanol evaluados presentaron un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25%; por el contrario los extractos de diclorometano solo fue del 18.5%. Para ambos ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} los extractos de metanol mostraron un porcentaje de actividad antioxidante mayor que los de diclorometano. Las especies más sobresalientes con su extracto de metanol fueron *Topobea cf discolor* (40,80%) y *Alchornea grandis* (39,27%) pertenecientes a las familias *Melastomataceae* y *Euphorbiaceae* respectivamente; adicionalmente con el extracto de diclorometano *Tovomita guianensis* (clusiaceae), el cual presentó el mayor porcentaje de actividad antioxidante con un valor de 54,97%; además de ello, ambos extractos de las plantas de la familia Clusiaceae fueron activas, debido a esto se escogieron las especies *Tovomita guianensis* y *Clusia multiflora* para realizar el perfil cromatográfico de flavonoides, buscando a la posible similitud fitoquímica y adicionalmente también se analizó el extracto de metanol de *Topobea cf discolor* por su destacado porcentaje de actividad antioxidante. Por medio de los espectros UV-Vis de las señales cromatográficas de cada extracto se logró identificar que los flavonoides más abundantes de estas plantas fueron flavonas y

flavonoles teniendo en cuenta que sus espectros revelaron dos bandas, una entre los 300-390 nm (banda I) característica para este tipo de flavonoides y otra entre los 220-290 (banda II) y en menor cantidad flavononoles, flavonononas e isoflavonas.

Los resultados obtenidos soportan el planteamiento de que algunas plantas medicinales prometen ser fuentes de antioxidantes naturales y que la actividad antioxidante de dichos extractos está relacionada con la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en la composición fitoquímica de la planta, que se pudo evidenciar en los espectros UV de los extractos. Los mejores resultados fueron obtenidos por *Tovomita guianensis* (Clusiaceae) con una actividad antioxidante de 54,97% y una abundancia alta de flavonoides lo cual es muy prometedor y podría analizarse con más detalle como alternativa natural.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) and other radicals can generate oxidative stress and inflict oxidative molecular damage to lipids, proteins and DNA when their production overwhelms the capacity of antioxidant defense systems. Oxidative stress plays an important role progression and/or perpetuation of a number of chronic diseases such as diabetes mellitus, cancer, atherosclerosis, arthritis, neurodegenerative diseases. A number of studies have shown that natural antioxidants such as phenolics and flavonoids have been shown to possess multiple pharmacological activities through their antioxidant properties.

In this study the antioxidant activity of thirty (30) methanol and dichloromethane plant extracts, from the eight different botanical families collected at the Regional Natural Park Ucumarí (RNPU, Risaralda, Colombia) were established by using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) y 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) radical-scavenging assay. Also a high performance liquid chromatography method coupled with diode array detection was developed to determine flavonoids in *Tovomita guianensis*, *Clusia multiflora* y *Topobea cf discolor*. HPLC analysis was carried out at wavelength 280, 330 y 350 nm. The chromatographic separation was performed on Hypersil ODS column (5 µm, 250 x 4 mm).

The methanol plant extracts that showed the greatest antioxidant activity were *Topobea cf discolor* (Melastomataceae, UTP 160) with 40,80% (IC₅₀: 49,18 µg/mL) y *Alchornea grandis* (Euphorbiaceae, UTP 202) with 39,27% (IC₅₀: 7,24 µg/mL). The dichloromethane plant extracts that showed the greatest antioxidant activity were *Tovomita guianensis* (Clusiaceae, UTP 159) with 54,97% (IC₅₀: 7,24 µg/mL). In crude methanolic and dichloromethane extract of *Tovomita guianensis*, *Clusia multiflora* y *Topobea cf discolor*, were identified in general flavones, flavonols, flavonones, flavononols and isoflavones through UV spectra of each extract.

AGRADECIMIENTOS

El autor del proyecto expresa su gratitud a:

Aquellas personas que de una u otra manera permitieron llevar a cabo este proyecto y realizar una investigación sólida de la actividad antioxidante de las plantas autóctonas de nuestro país, dejando puertas abiertas al descubrimiento de alternativas antioxidantes naturales.

Al grupo de educadores en especial a los profesores Oscar Marino Mosquera y Jaime Niño Osorio por sus consejos, enseñanzas y paciencia durante la realización de este proyecto; además, por permitirme ser parte de la familia del GB-PN.

A la Universidad Tecnológica de Pereira a través de la Vicerrectoría de Investigación, Innovación y Extensión de la UTP, por la financiación aportada para realizar este proyecto.

A mis padres que con su apoyo incondicional y sus consejos durante el transcurso de la carrera, permitieron mi crecimiento como persona y como profesional.

1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son conocidas como moléculas que actúan antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos (Cardoso et al., 2005). Por otro lado, los prooxidantes son especies altamente reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes (Carocho et al., 2013) y se encuentran tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos.

En los alimentos el proceso de auto-oxidación y generación de la rancidez es causado por radicales libres como consecuencia de la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, produciendo muchas enfermedades degenerativas (Suja et al., 2004). Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo genera el fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual es clave en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoidea, algunas formas de anemia, diabetes, entre otras (Tapia et al., 2004; Celik et al., 2010).

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado dramáticamente, debido principalmente a tres razones: (1) la baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos, (2) la eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos, y (3) la idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados (Dorman et al., 2004).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los

cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah et al., 2007).

Por esta razón, que se pretende encontrar antioxidantes naturales en plantas de la flora de la Ecorregión Cafetera (EC) pertenecientes a las familias Apiaceae, Apocynaceae, Asclepidaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Passifloraceae, Piperaceae, Rubiaceae y Solanaceae, debido a la importancia de conocer nuevos agentes con propiedades antioxidantes y a la facilidad de acceso a recursos naturales propios.

2. MARCO TEORICO

2.1 Especies reactivas del oxígeno

El oxígeno está directamente asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad conocidas como "Especies Reactivas de Oxígeno" (ERO) (Gil del Valle, 2011). Entre las ERO se encuentran los radicales libres (RL) [cualquier especie molecular con uno o más electrones desapareados, (Ziech et al., 2011)] y moléculas derivadas del oxígeno que posean alta capacidad reactiva (Li et al., 2011).

El O_2 molecular es un biradical que tiene 2 electrones sin aparear. Sin embargo, los dos electrones sin aparear tienen el mismo spin, lo que impide que el O_2 reaccione directamente con otros compuestos. El principio de exclusión de Pauli (PEP) (1925) establece que un orbital atómico no puede ser ocupado por más de dos electrones, los cuales deben tener spines contrarios ($+\frac{1}{2}$ y $-\frac{1}{2}$). La restricción de spin puede eliminarse de tres formas (lo que permite que el O_2 pueda ser utilizado para la generación de energía):

1. Al excitarse el O_2 , uno de los electrones sin aparear puede pasar a otro orbital de más energía y así invertir su spin. De esta manera se forma el oxígeno singlete (altamente reactivo) conocido como 1O_2 .
2. La unión del O_2 a un metal de transición que contiene electrones sin aparear forma complejos que pueden aceptar un par de electrones de otros sustratos sin violar el PEP.
3. Añadiendo electrones al O_2 paso a paso. La reducción univalente del O_2 implica la producción de especies parcialmente reducidas de O_2 (ver figura 1).

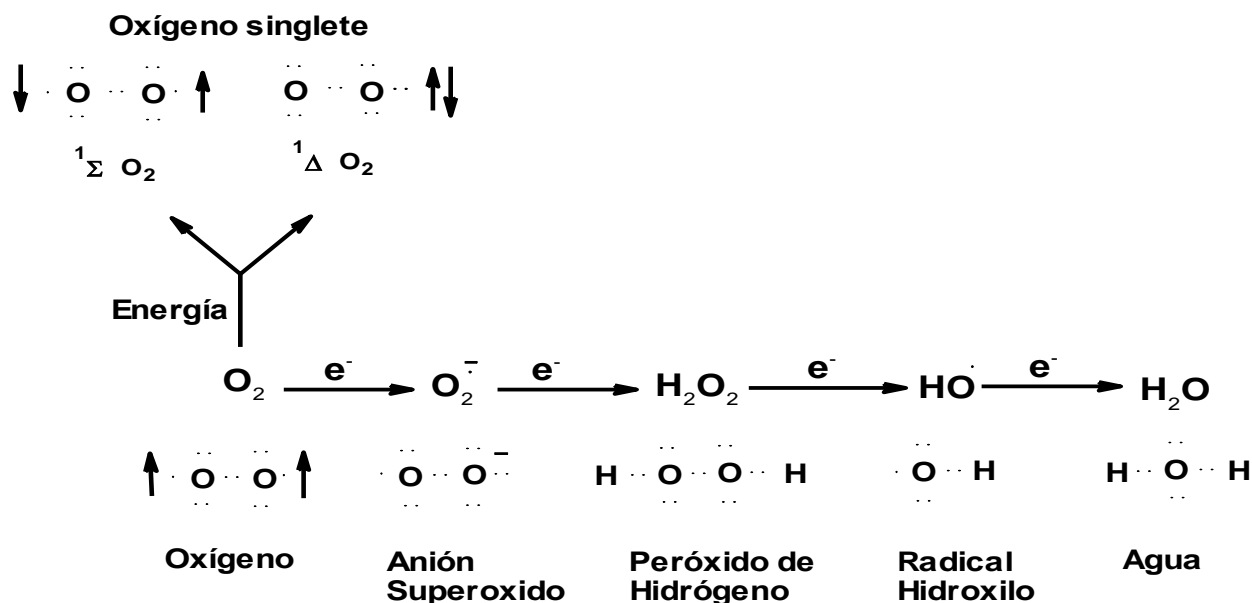


Figura 1. Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones (León de Fernandez, 2004).

Se considera que las especies reactivas del oxígeno (ERO) a bajos niveles fisiológicos pueden funcionar como mensajeros secundarios de ligandos específicos incluyendo el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptores de la angiotensina II (ATII) y el factor de crecimiento de fibroplastos (FGF2), mediando varias respuestas biológicas que incluyen la expresión de genes, proliferación celular, angiogénesis, inmunidad innata, muerte celular programada (apoptosis) y senescencia (Misrha et al., 2012). De otra lado, bajo condiciones patológicas, los niveles de EROS dramáticamente elevados también llamado estrés oxidativo (Li et al., 2011), dañan las proteínas, membranas y ácidos nucleicos a nivel celular y perturban el balance redox celular (Fransen et al., 2011).

2.2 Principales fuentes o mecanismos generadores de ERO

Los mecanismos fundamentales por los que se generan EROS son:

1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial

La mitocondria cumple con la mayoría de los requerimientos energéticos de la célula a través del metabolismo oxidativo (Carneiro et al., 2012), la cual es considerada como la mayor fuente de ERO (Li et al., 2011), aproximadamente entre el 1-5% del oxígeno total consumido por la mitocondria es convertido en EROS por reducción parcial del oxígeno al anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Brawek et al., 2010), como se describe en la figura 2.

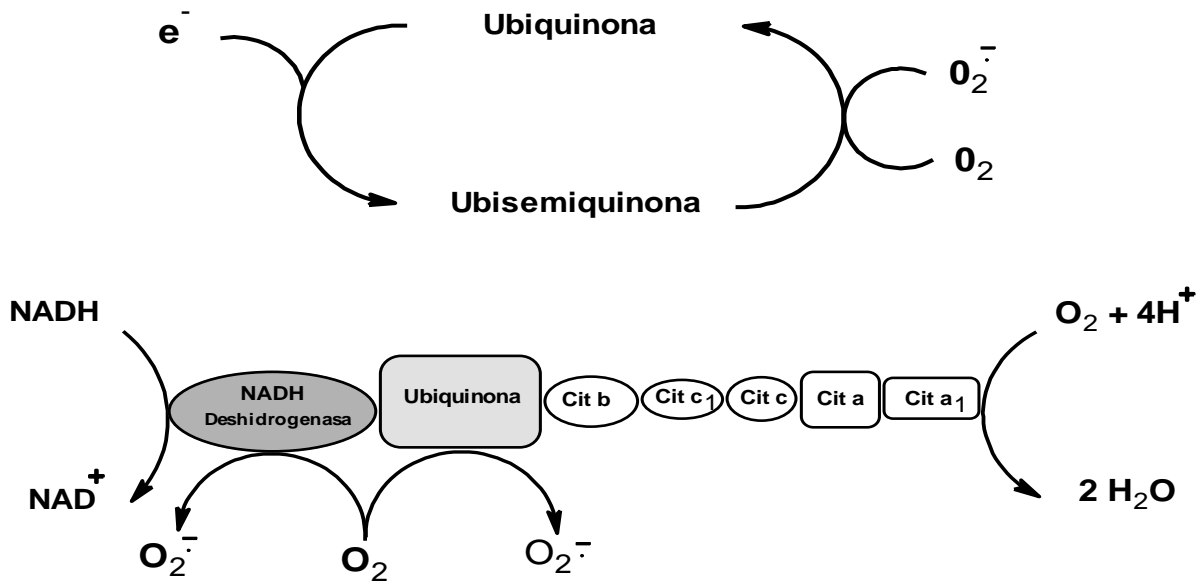


Figura 2. Producción del anión radical superóxido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial (León de Fernandez, 2004).

2. Iones de metales de transición (figura 3)

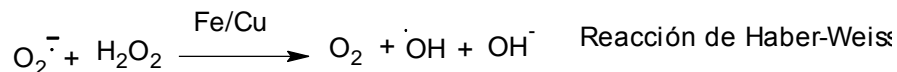
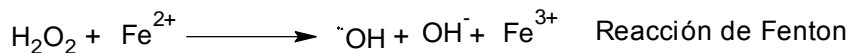
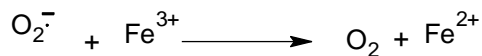


Figura 3. Reacciones de Fenton y Haber-weiss

3. Reacciones bioquímicas redox dependientes de O_2 que tienen lugar en el metabolismo celular Monoamino-oxidasa (MAO).
4. Exceso de ejercicio físico
El consumo de O_2 por el organismo durante el ejercicio físico aumenta 20 veces y en el músculo esquelético hasta casi 100 veces, para incrementar la producción de ATP por la fosforilación oxidativa mitocondrial (Pepe et al., 2009). EL aumento en la utilización del O_2 trae consigo un incremento en la generación de $O_2^{\bullet-}$.
5. La radiación ionizante proveniente de la atmósfera o de la radioterapia es absorbida fundamentalmente por el H_2O (por su abundancia), produciéndose un gran número de especies reactivas (H^{\bullet} , $\cdot OH$, H_2O_2 , H_2O y H_3O^+) en aproximadamente 10^{-9} segundos luego de la exposición.
6. Pesticidas, contaminantes, humo de cigarrillo y algunos medicamentos (Tawaha et al., 2007).

2.2.1 Las ERO más representativas y sus características

2.2.1.1 Especies radicalarias

Dentro de las especies radicalarias de mayor interés desde el punto de vista biológico están el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO^{\bullet}), hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), peroxilo (RO_2^{\bullet}), alcoxilo (RO^{\bullet}) (Carocho et al., 2013).

2.2.1.2 Especies no radicalarias

Las especies no radicalarias de mayor interés biológico son: ácido hipocloroso ($HOCl$), peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2) (Carocho et al., 2013).

2.3 Toxicidad celular de las ERO (blancos principales)

Las alteraciones funcionales, mediadas por ERO, son una consecuencia directa de sus interacciones con macromoléculas esenciales. Pueden reaccionar indiscriminadamente con moléculas como proteínas, lípidos y ADN convirtiéndolas en moléculas "blanco" y generando un gran número de lesiones oxidativas (Weyemi et al., 2012).

2.3.1 Interacción con el ADN

Los daños fundamentales son la hidroxilación de las bases nitrogenadas que constituyen el ADN, entre-cruzamientos e inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos grasos y son causados por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

2.3.2 Interacción con las proteínas

Muchas ERO son capaces de oxidar los grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}$) de las proteínas; en ocasiones generan daños puntuales a las proteínas que están unidas a metales de transición. También puede causar la oxidación de los grupos amino de los aminoácidos y grupos carbonilos.

2.3.3 Interacción con lípidos

Las ERO provocan la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados y de los fosfolípidos de las membranas. La peroxidación lipídica (POL) conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, originando alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total. Los procesos de peroxidación conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos como los hidroperóxidos, el malondialdehído (MDA, figura 4) entre otros.

2.4 Mecanismos de defensa antioxidante

Las ERO se generan en muchas células bajo condiciones fisiológicas y el organismo utiliza mecanismos potentes de defensa para evitar la acumulación de las ERO, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos se destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 en los tejidos y a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas (Gil del Valle et al., 2011).

El primer componente de los mecanismos de defensa antioxidante es la barrera fisiológica que limita el paso del oxígeno desde el aire inspirado hasta las células. El resto de los componentes se describen a continuación.

2.4.1 Antioxidantes primarios:

Los llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas ERO. Esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las siguientes enzimas (Katalinic et al., 2005):

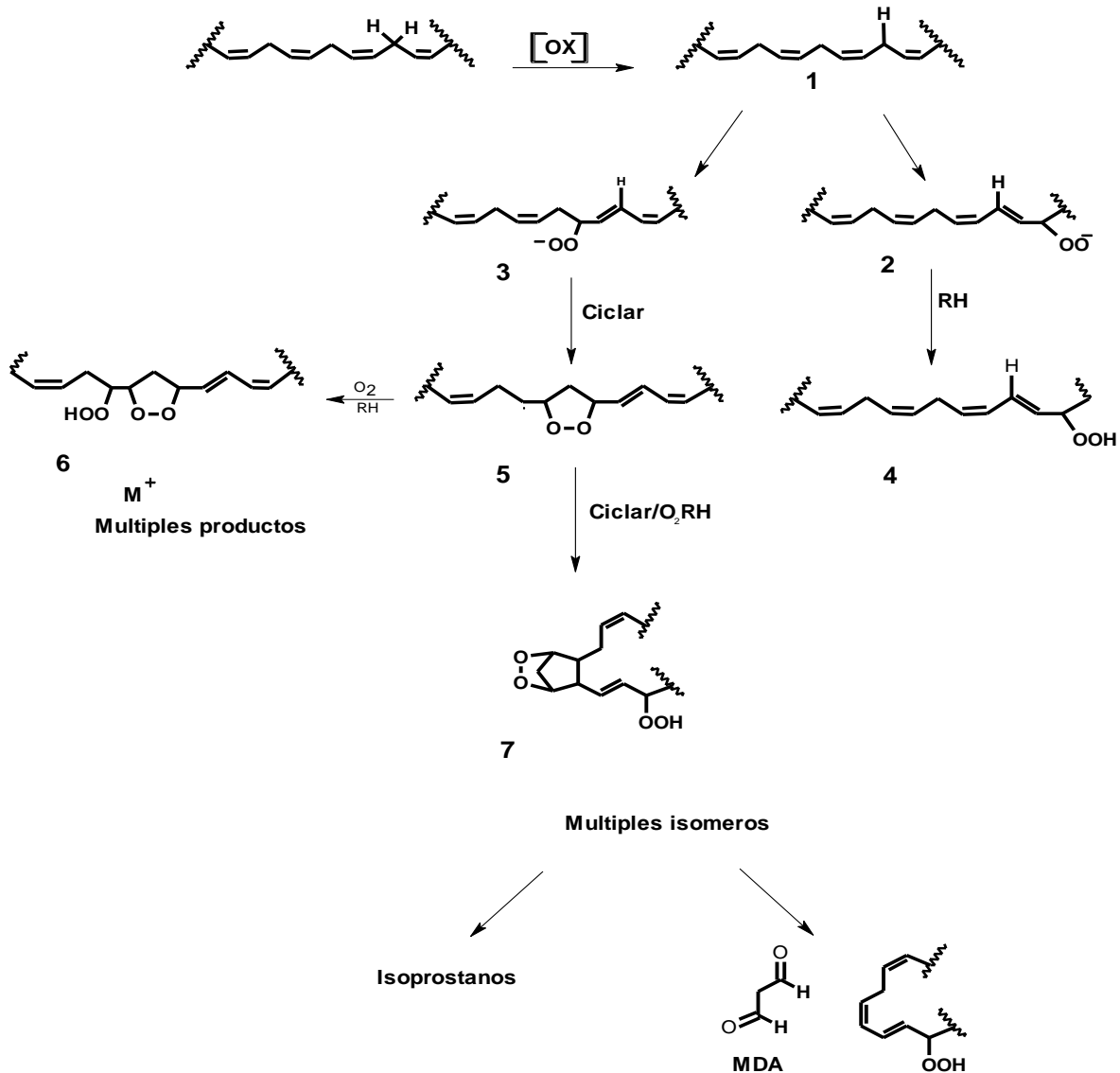


Figura 4. Vías de peroxidación lipídica (Marnett 1999).

- ✓ Las Superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes CuZn-SOD y Fe/Mn-SOD y catalizan la conversión de $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 y O_2 (Pareja et al., 2010). En los organismos eucariotas existen cuatro tipos diferentes de SOD, donde:

- *Cu/ZnSOD*: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y cinc (primera línea de defensa antioxidante).
 - *Fe/MnSOD*: Superóxido dismutasa dependiente de hierro y Manganeseo
 - *EC-SOD*: Superóxido dismutasa extracelular (participa en el control primario de la inactivación del NO).
 - *NiSOD*: Superóxido dismutasa dependiente de níquel (presente en microorganismos).
- ✓ Las Glutación peroxidasas (GPx), son dos enzimas selenio dependientes puesto que este las mantiene activas (Cemeli et al., 2009). para que ejerzan su acción detoxificante por la reducción del H_2O_2 o los ROOH. La glutación peroxidasa (GPx) está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida glutathiona (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontradas en el tejido humano.
- ✓ La catalasa participa en el metabolismo del H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo. Aunque su afinidad por el H_2O_2 es inferior a la que muestra la GPx, bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del H_2O_2 , ésta cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O . A altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo la su reducción ; por el contrario, a bajas concentraciones de H_2O_2 decrece su eficiencia (Cemeli et al., 2009).

Este grupo de antioxidantes primarios se completa con: el sistema de las tiorredoxinas, que incluye las tiorredoxinas y la tiorredoxina reductasa, las cuales soportan muchos procesos cruciales para la función celular, proliferación celular, defensa antioxidante y regulación redox (Arnér, 2009), las transferrinas, regulan la producción extracelular de hierro y así previen la oxidación de los tejidos (Kim et al., 2008), la lactoferrina, la cual tiene la capacidad de capturar iones de hierro libre lo cual le confiere muchas propiedades de antioxidante (Mulder et al., 2008). La ferritina, proteína que funciona capturando el hierro libre intracelular que puede convertirse en tóxico para la células (MacKenzie et al., 2008), la ceruloplasmina y las

albúminas representan el antioxidante mas predominante presente en el plasma, el cual está expuesto a estrés oxidativo continuo (Roche et al., 2008).

2.4.2 Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos son la vitamina E y C, β -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran glutatión urato, bilirrubina y ubiquinona, sus estructuras se muestran en la figura 5 (Doria et al., 2012).

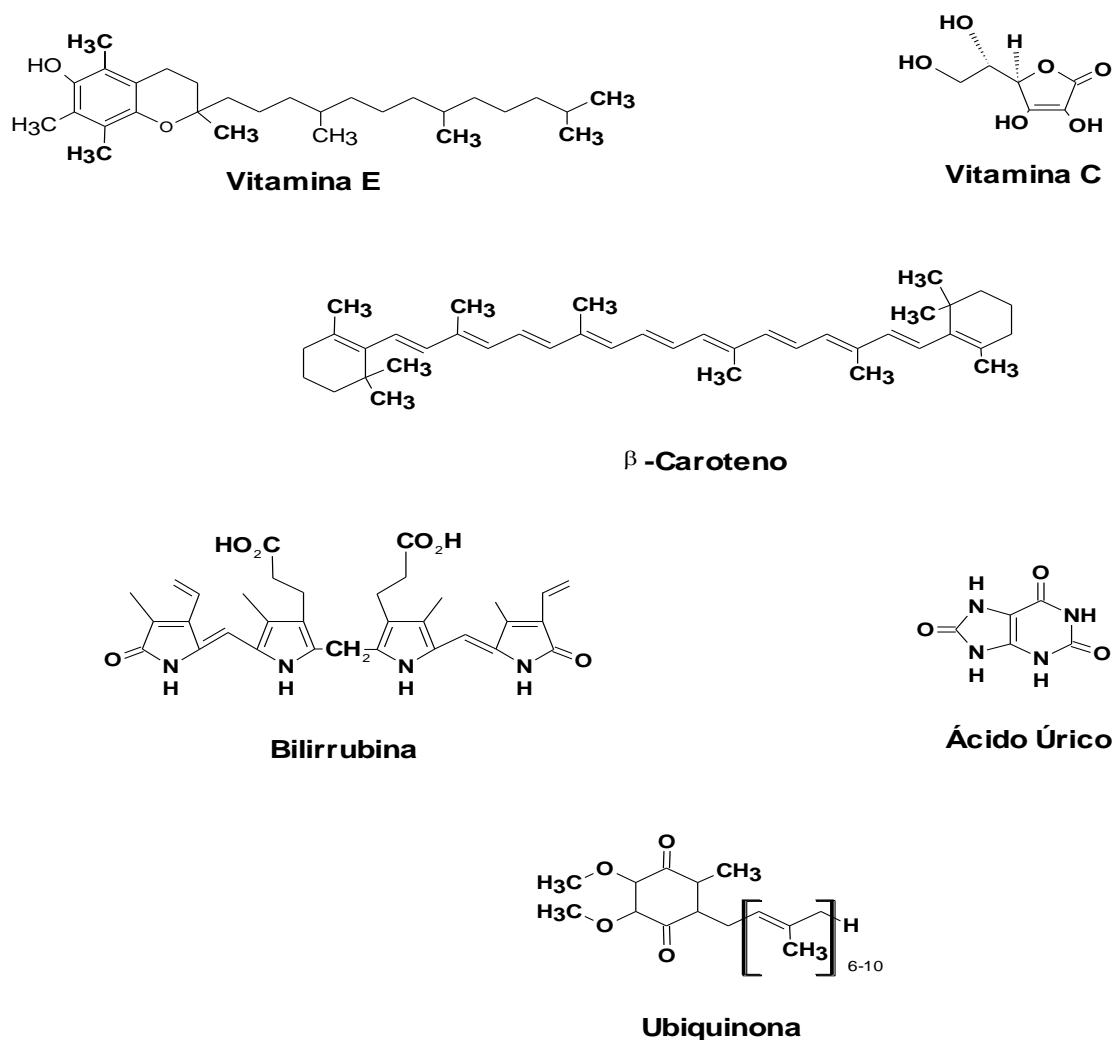


Figura 5. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de los mecanismos de defensa en el organismo humano.

La vitamina C, presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que esta puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación y posiblemente un anunciador de enfermedades del corazón (Podsdek, 2007).

La vitamina E pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles, tocotrienoles, especialmente α -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperoxil, como se muestra en la figura 6 (Podsdek, 2007).

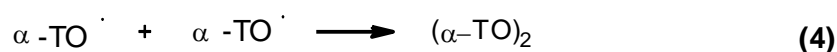
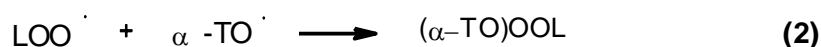
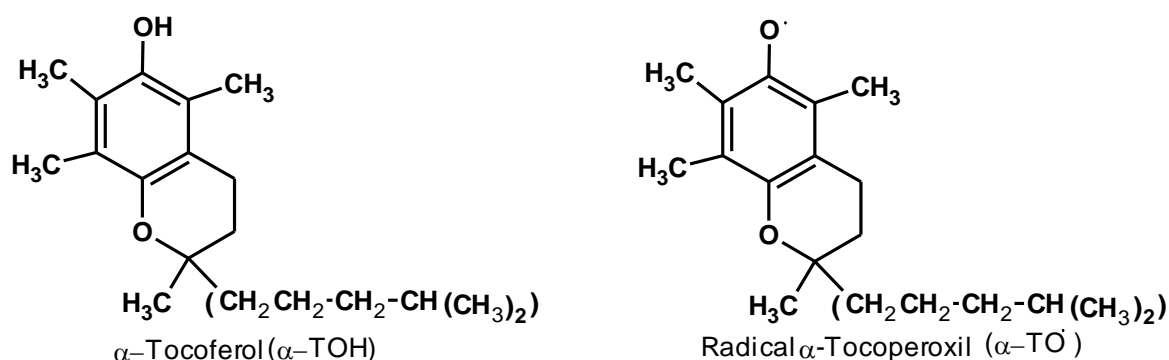


Figura 6. Reacción del tocoferol para formar el radical peroxil (Webster, 1999).

2.4.2.1 Sustancias endógenas con capacidad antioxidante

a. Glutación (GSH) (Pastore et al., 2003)

Es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina), que se encuentra en todas las células en concentraciones relativamente altas (0.4-12 mM) y es el compuesto

con grupos SH más abundante en los tejidos (SH no protéicos), sus funciones son:

- a. Detoxificación de compuestos electrofílicos
- b. Captura de radicales libres
- c. Co-factor de GPx
- d. Mantenimiento de los grupos SH en proteínas al prevenir su oxidación
- e. Reservorio de cisteína (Cys).

b. Urato (Cutler, 1984)

El urato está presente en el plasma en el rango de 180-420 μM . Es capaz de quelatar el hierro (Fe) y el cobre (Cu); además, reacciona con HClO, atenuando la oxidación de lípidos, lipoproteínas y ácidos grasos polinsaturados inducida por ozono y eliminando directamente los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo.

c. Bilirrubina (Asad et al., 2001)

La bilirrubina está presente en el plasma en concentraciones menores de 20 μM . Es capaz de eliminar el oxígeno singlete y radicales peroxilos. La bilirrubina unida a la albúmina plasmática contribuye significativamente a las defensas antioxidantes no enzimáticas presentes en el plasma.

d. Ubiquinonas (coenzima Q) (Bentiger et al., 2007)

Las ubiquinonas son derivados de las quinonas que contienen una cola de isopreno. La forma reducida de las ubiquinonas, los ubiquinoles, son liposolubles y actúan como antioxidantes eficientes y tienen mayor capacidad antioxidante que las ubiquinonas.

2.4.3 *Antioxidantes terciarios*

Los antioxidantes terciarios son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurínica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN (Page et al., 2009) y la metionina sulfóxido reductasa.

Los antioxidantes juegan un papel importante previniendo o aliviando afecciones crónicas, incluyendo cáncer, alteraciones cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis, diabetes, asma, hepatitis, artritis y inmunodeficiencia (Siddhuraju et al., 2007). Estos reducen el daño oxidativo a

los componentes celulares causados por las ERO. El uso de los antioxidantes sintéticos en productos alimenticios esta bajo estricta regulación, debido a la incertidumbre sobre su seguridad. Por esta razón hay un interés creciente en los antioxidantes naturales para atenuar el daño oxidativo (Jaitak et al., 2010), puesto que estos antioxidantes derivados de plantas funcionan como captadores de oxígeno singlete y triplete, eliminadores de peróxidos e inhibidores de enzimas (Choi, 2002).

Durante muchos años las plantas han sido usadas en muchos campos, incluyendo medicina, nutrición, saborizantes, bebidas, repelentes, fragancias, cosméticos, cigarrillos y otros propósitos industriales. Desde épocas remotas las plantas han sido la base para casi todas las terapias medicinales, hasta cuando las drogas sintéticas se desarrollaron en el siglo XIX (Djeridane et al., 2006), ya que estas contienen una amplia variedad de moléculas con actividad antioxidante, como flavonoides, antocianinas, carotenoides, vitaminas, metabolitos endógenos, y productos naturales con actividad antioxidante.

2.5 Determinación de la actividad antioxidante

2.5.1 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Según Clarkson, (1995), la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* (tabla 1) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro.

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Huang et al., 2005).

Tabla 1. Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET o HAT

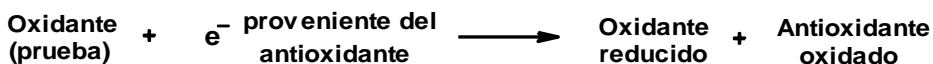
ENSAYO	CATEGORIA
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS ^{•+})	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH [•])	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N- dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang et al., 2005). En la figura 7 se muestran las reacciones específicas para los ensayos basados en la transferencia de electrones y en la transferencia de átomos de hidrógeno.

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH[•] es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y

de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS^{•+} se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam et al., 2012). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.

Ensayos ET



Ensayos HAT

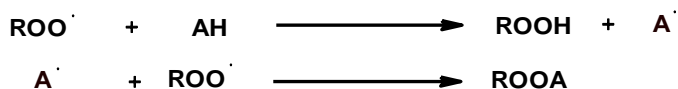


Figura 7. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Huang et al., 2005).

2.5.2 Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 8, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH[•] ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la

literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha et al., 2012).

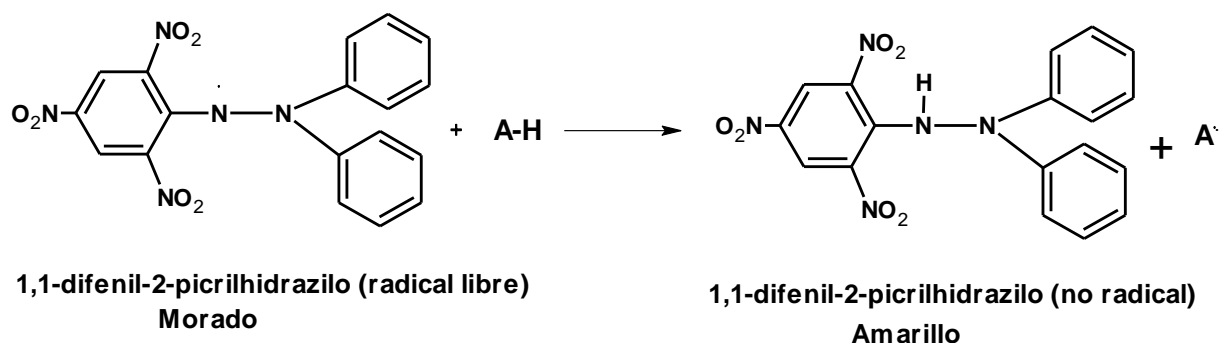


Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)

Los resultados del ensayo DPPH[•] se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC₅₀ cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH[•] usado (Deng et al., 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH[•] es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios

involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH[•]. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC₅₀ que van en un rango de 1.15 min (Acido ascórbico) a 103 min (Rutina).

- La reacción cinética entre el DPPH[•] y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH[•], por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC₅₀.
- La reacción de DPPH[•] con eugenol fue reversible (Vondet et al., 1997), lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

2.5.3 Ensayo ABTS^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

La generación del radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1999).

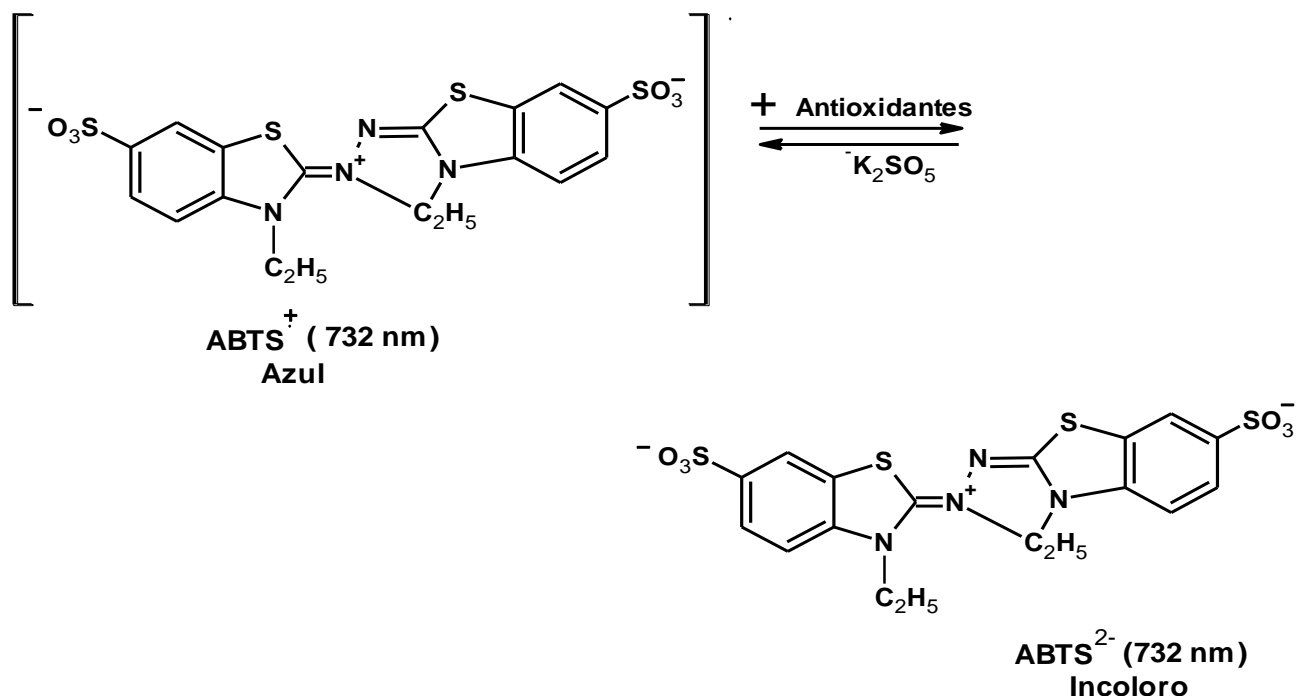


Figura 9. Estructura del ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009).

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+}, implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

2.6 Contenido de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C)

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton et al., 1999). Inicialmente, fue aplicado al análisis de

proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. De hecho, el ensayo de F-C mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferenciencia de electrones entre el Mo(IV) y el reductor como se muestra en la figura 10 (Huang et al., 2005). El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco et al., 2009).



Figura 10. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005).

En el ensayo F-C original, se usa el buffer de carbonato para ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 min aproximadamente a temperatura ambiente. Aunque es un tiempo demasiado extenso y dificulta la implementación de un análisis de rutina, aún es utilizado por algunos investigadores. En diferentes trabajos se ha variado concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, buscando una reducción significativa del tiempo necesario para llegar a un estado estacionario. Magalhães et al., (2010) adaptó el método, en el cual se varia la alcalinidad, al reemplazar el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio logrando disminuir el tiempo de reacción a 4 min y conseguir resultados altamente confiables. Al final se

debe tener muy presente la concentración alcohólica en la mezcla, puesto que según Singleton et al., (1999) el incluir solventes diferentes al agua en las muestras, algunas veces puede interferir la formación de la solución azul.

2.7 Identificación de flavonoides

Polifenoles, antocianinas y flavonoides son constituyentes de las plantas muy valiosos en la captura de radicales libre, debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos presentes en su estructura (Kumarappan et al., 2012). Los flavonoides pertenecen a la mayor clase de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas y entre ellos se pueden encontrar flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononoles, catequinas, flavononas (Heim et al., 2002), sus estructuras se muestran en la figura 11. Aparecen frecuentemente en forma de O-glicosidos, conteniendo o no azúcares en su estructura (Spácil et al., 2008).

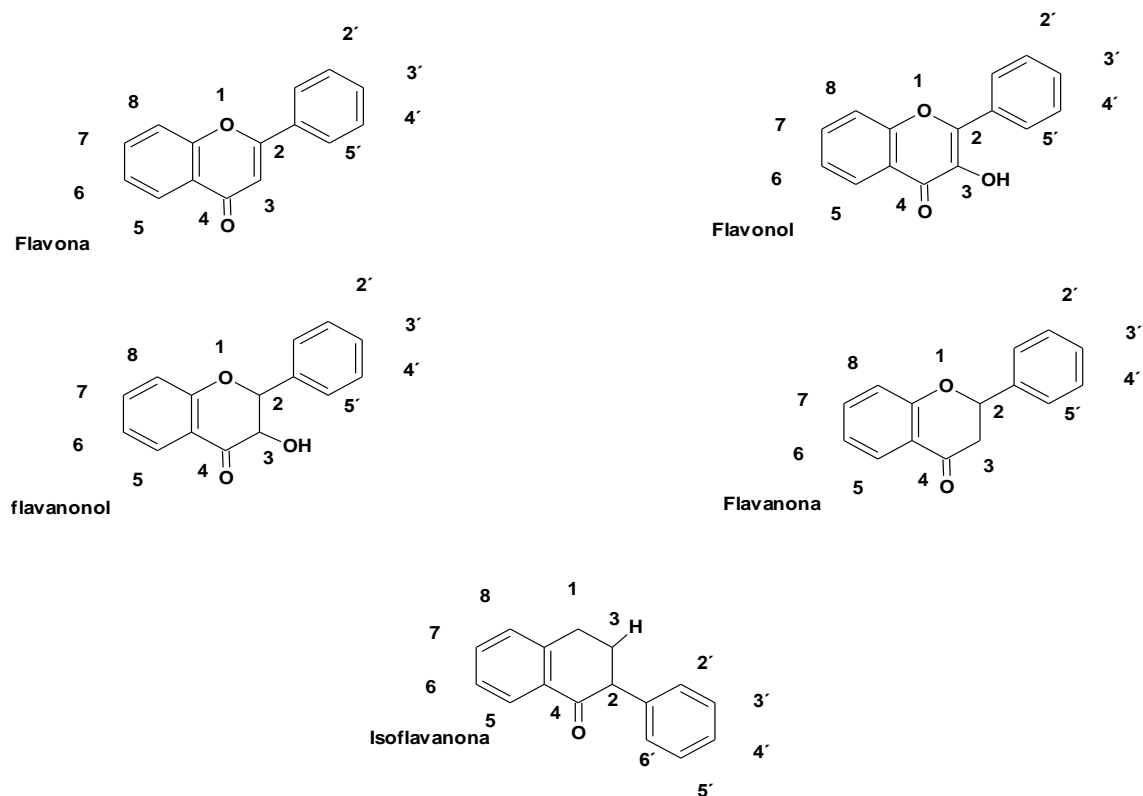


Figura 11. Estructuras químicas de los diferentes flavonoides (Samprieto et al., 2009).

En la actualidad hay un creciente interés enfocado en los flavonoides, puesto que se ha evidenciado su gran importancia en la dieta humana debido a la gran variedad de actividades biológicas que estos presentan; entre ellas inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa, lipoxigenasa), efectos antibacteriales, actividad antiinflamatoria y antioxidante. Puesto que estos actúan como antioxidantes; ayudan a contrarrestar o disminuir el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares (Crozier et al., 1997), el estrés oxidativo (Andersen et al., 2006).

Los flavonoides pues ser separados, cuantificados e identificados a través de técnicas de HPLC acoplada a detectores UV, masas, o resonancia magnética nuclear (RMN) (Andersen et al., 2006).

2.7.1 Determinación e identificación de flavonoides

2.7.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En la detección de flavonoides por HPLC analítico generalmente se utilizan sistemas de elución binarios, con un solvente polar acuoso acidificado con: ácido acético, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido perclórico y un solvente orgánico menos polar como metanol y/o acetonitrilo posiblemente acidulado (Merken et al., 2000) variando las condiciones según el tipo de flavonoide y en su gran mayoría las corridas se hacen con una columna de ODS (RP-18 o C₁₈).

En gran parte su detección esta basada en la absorción UV-Vis y una sola longitud de onda no es ideal para todas las clases de flavonoides, puesto que estos muestran máximos de absorción a diferentes longitudes de onda. Es muy común el uso de un detector de arreglo de diodos DAD (el cual permite la cuantificación simultánea a diferentes longitudes de onda) (Matilla et al., 2000).

En la figura 12 se puede observar el perfil cromatográfico de 28 polifenoles diferentes y el orden aproximado en el que aparecen a una longitud de onda de 280 nm.

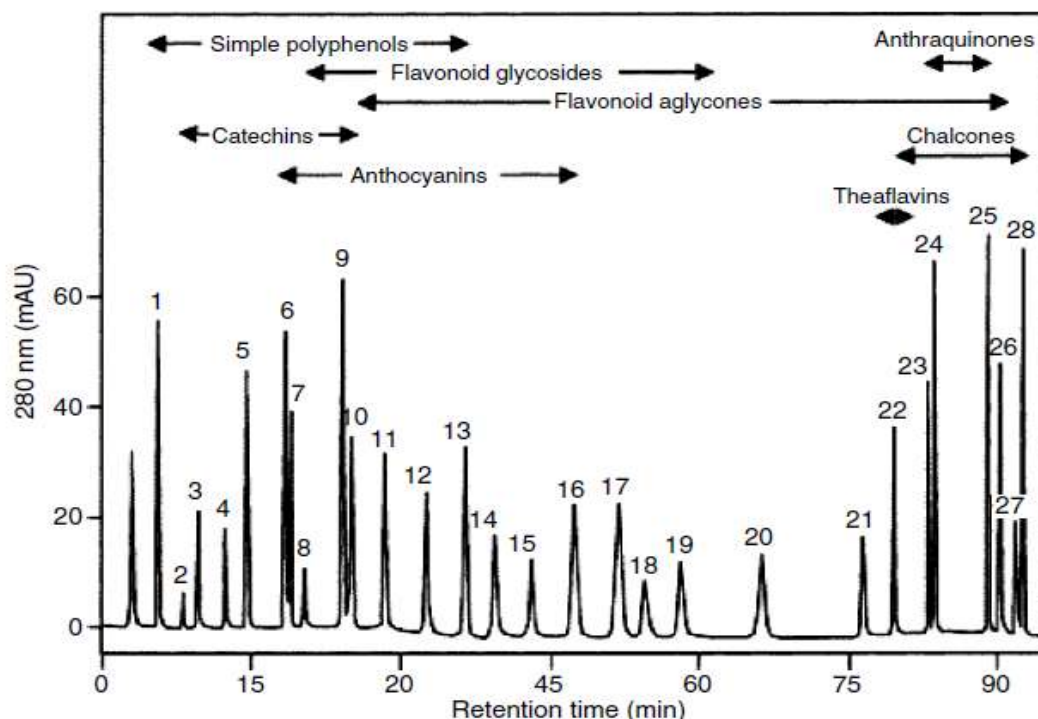


Figura 12. Perfil cromatográfico) de 28 diferentes polifenoles, columna Capcell pack C18 UG120 (250 x 4.6 mm, S5, 5 μ m) a 35°C. Solucion A (fosfato de sodio 50 mM [pH 3.3] y metanol 10%) solución B (metanol 70%). Gradiente de elución 0 min 100% A, 0-15 min 70% A, 15-45 min 65% A, 45-65 60%A, 65-70% 70% A y 70-95 100% B, con un flujo de 1 ml/min (Andersen et al., 2006).

2.7.1.2 Cromatografía líquida- UV

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) está basada en la absorción de la radiación UV-Vis por una molécula, causando la promoción de algunos electrones de un estado de energía basal a uno excitado. La absorción del espectro UV-Vis de los constituyentes de las plantas puede ser medido contra un blanco usando un espectrofotómetro (Pavia et al., 1979).

La estructura general de los flavonoides (figura 13) esta asociada a un sistema benzoilo del anillo A y a un sistema cinamoilo del anillo B el cual facilita el análisis de flavonoides, puesto que el espectro ultravioleta del benceno presenta una muy buena estructura debido a la interacción vibracional y

electrónica de sus niveles de energía. Este excelente cromóforo (grupo funcional que absorbe luz ultravioleta) presenta tres bandas de absorción a 184, 202 y 255 nm (Cooper 1980). Cuando el anillo presenta sustituciones, puede por consiguiente, haber conjugaciones, las cuales van a presentar desplazamiento batocrómicos en el espectro UV y proporcionar información estructural que permita identificar sus patrones de oxidación y tipo de flavonoide (Andersen et al., 2006).

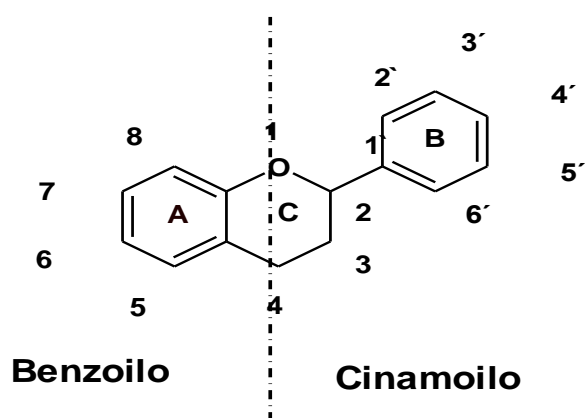


Figura 13. Estructura general de los flavonoides (Heim et al., 2002).

En la table 2 se presentan las longitudes de onda de la banda I y la banda II en el espectro UV-VIs de las diferentes clases de flavonoides.

Tabla 2. Clasificación de flavonoides según sus espectros UV (Andersen et al., 2006; Samprieto et al., 2009).

Tipo de compuesto	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Flavonas y flavonoles	320-370	240-290
Flavonononas y flavononoles	270-295	236
Isoflavonas	300-330	240-270
Auronas	430	370
Cumarinas	311	274

Las longitudes de onda que se presentan en la tabla son aproximadas, puesto que los espectros pueden presentar desplazamientos dependiendo del grado de sustitución o glicosidación de los flavonoides presentes en la muestra.

Las flavonas y flavonoles pueden presentar un desplazamiento batocrómico si se incrementa la oxidación del anillo B y como consecuencia en la banda II pueden aparecer uno o dos picos mas dependiendo de los patrones de oxidación.

Las flavonononas, los flavononoles e isoflavonas tienen un espectro muy similar debido a que puede haber una conjugación mínima o nula entre el anillo A y B. La diferencia esta basada en el pico máximo de absorción el cual se presenta en un rango de longitudes de onda para flavononas y flavononoles y otro para isoflavonas (Samprieto et al., 2009), además Las isoflavonas presentan un pico de muy baja intensidad en el rango de 300-330 nm (banda I) (Andersen et al., 2006).

Las chalconas y las auronas se caracterizan por una absorción intensa en la banda I y una absorción disminuida en la banda II. Un incremento en la oxigenación del anillo A o B causa desplazamientos hipsocrómicos de la banda I (Samprieto et al., 2009).

2.8 Características de las familias de plantas a estudiar

Este estudio se realizó con 30 especies de plantas, recolectadas en dos reservas naturales: La Reserva Natural Bremen-La Popa (RNB-P) y el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU).

RNB-P está ubicada en el alto el roble, sobre el margen izquierdo de la vía que conduce de Armenia a Pereira. El 89% de la reserva pertenece al municipio de Filandia y el 11% restante al municipio de Circasia. La altura varía entre 1850 y 2050 m.s.n.m, la temperatura oscila entre 13 y 15°C y la humedad relativa promedio es de 81,4%; esta constituida básicamente por pastizales, bosque nativo y bosque plantado. El Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) está

ubicado en el flanco occidental de la cordillera central entre 1850 y 2600 msnm. El acceso al parque se realiza por vía vehicular, trazada paralelamente al río Otún, desde el municipio de Pereira, hasta la Estación Piscícola del Cedral con un recorrido total de 22 km. La altura varía entre 1800 y 2600 m.s.n.m, la temperatura oscila entre 12 y 18°C.

Las familias a las que pertenecen las plantas colectadas fueron: Apiaceae, Apocynaceae, Asclepidaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Passifloraceae, Piperaceae, Rubiaceae y Solanaceae. A continuación se describe de manera general las características botánicas de las familias estudiadas en este proyecto.

2.8.1 Familia Apiaceae

La familia Apiaceae, hasta hace poco denominada y aún tratada como *Umbelliferaceae* en diversos artículos y textos, agrupa más de 455 géneros y con más de 3.600 especies dispuestos en tres subfamilias Hydrocotyloideae, Saniculoideae y Apioideae, las que se encuentran ampliamente difundidas en el mundo, aunque la mayoría tiene su origen en las zonas templadas del hemisferio norte. Las plantas de la familia Apiaceae son conocidas por acumular flavonoides, en su gran mayoría en forma de flavones y flavonoles (Abdulmanea et al., 2012).

Desde la antigüedad, a muchas de estas especies se les ha atribuido propiedades medicinales. En la actualidad existe un interés renovado en su utilización como pesticidas, puesto que algunas especies muestran potente actividad larvicida contra los mosquitos (Evergetis et al., 2013).

Se emplean como verduras para consumo humano (zanahoria: *Daucus carota*; apio: *Apium graveolens*), condimentarias (perejil: *Petroselinum crispum*; eneldo: *Anethum graveolens*) o medicinales. Algunas son venenosas por su contenido en alcaloides, como la cicuta (*Conium maculatum*). Entre las ornamentales destaca *Heracleum mantegazzianum* por su gran tamaño, y que se ha convertido en invasora en algunos de los países donde se cultiva.

2.8.2 Familia *Apocynaceae*

La familia *Apocynaceae*, si se tiene en cuenta la inclusión de las *Asclepiadaceae* como lo han sugerido estudios moleculares y filogenéticos recientes. Es una de las familias más grandes de las Angiospermas, con un total de alrededor de 355 géneros y 3700 especies, distribuidas principalmente en las regiones tropicales (Morales, 2006).

Las plantas de la familia *Apocynaceae* merecen especial atención debido a que estas contienen aceites e hidrocarburos ricos en latex. Muchas especies tienen la capacidad de crecer sin requerimientos de agua y sin manejos agronómicos en terrenos valdíos y por tal razón se convierten en una herramienta muy útil para las plantas petroleras en lo que a reducción de costos se refiere (Augustus et al., 2011).

Las plantas de la familia *Apocynaceae* son ricas en alcaloides con diversas estructuras (Ayyad et al., 2012), compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, glicosidos, terpenoides, quinonas, fitoesteroides, proteínas y carbohidratos (Joselin et al., 2012).

2.8.3 Familia *Clusiaceae*

Familia formada por árboles y arbustos, raras veces hierbas, con jugos resinosos o glándulas oleosas amarillentas o verdosas. Hojas opuestas o verticiladas, simples, a menudo engrosadas, generalmente siempreverdes, enteras, sin estípulas. Flores regulares, bisexuales o unisexuales en plantas separadas; solitarias o en inflorescencias cimosas. Tienen 2-14 sépalos, 2-14 pétalos y numerosos estambres libres o ligeramente unidos en la base o en 2-5 haces. Fruto bacciforme, drupáceo o capsular, con semillas a veces aladas.

La familia *clusiaceae*, también llamada *guttiferae*, es una familia de plantas que comprende unas 1200 especies en una cincuentena de géneros. Son por lo general árboles o arbustos, con savia lechosa y frutos en forma de cápsula.

Las plantas de esta familia son fuente principalmente de xantonas, benzofenonas, así como también de triterpenos, flavonoides y lactonas (Cuesta-Rubio et al., 2005)

2.8.4 Familia *Euphorbiaceae*

La familia *Euphorbiaceae* es la sexta familia más diversa entre las Angiospermas. Presenta cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies (Mabberley, 1998) distribuidas en todo el mundo, con excepción de las zonas polares, estando mejor representadas en las regiones tropicales y subtropicales (Matinez et al., 2002).

La familia *Euphorbiaceae* está representada en Colombia por 78 géneros, 390 especies, 12 subespecies y 9 variedades; están ampliamente distribuidas en todas las regiones de Colombia, la mayor parte de las especies se encuentran en la región andina (210 spp) de las cuales 83 son exclusivas de esta zona.

2.8.5 Familia *Melastomataceae*

La familia *Melastomataceae* comprende unos 200 géneros y 4.500 especies de plantas herbáceas anuales o perennes, arbustos y árboles pequeños. Se distribuyen por las zonas tropicales (dos tercios de los géneros en América). Se identifican fácilmente porque sus hojas son simples opuestas, no poseen estípulas ni exudado u olor y porque sus hojas poseen venación acródroma.

Esta familia está representada en Colombia por 64 géneros nativos que incluyen más de 900 especies. Se encuentra en la mayoría de los ecosistemas terrestres (excepto ambientes desérticos) y desde el nivel del mar hasta las zonas de páramos (Mendoza et al., 2006).

El género *Tibouchina* está constituido por unas 350 especies distribuidas en Las Antillas y desde México hasta el sur de Brasil y norte de Argentina, el género crece desde el nivel del mar hasta zonas de páramos (Wurdack 1973, 1980). Para Colombia se conocen 28 especies en todas las ecorregiones; sin embargo, el mayor número de especies se concentra en la región andina (Mendoza et al., 2006).

El género Topobea está conformado por alrededor de 50 especies distribuidas desde sur de México hasta Bolivia y Brasil (Amazonia). Para Colombia se conocen unas 40 especies distribuidas en el Chocó Biogeográfico, Magdalena Medio, Sierra Nevada de Santa Marta, Orinoquia y Amazonia, entre los 0 y 2.800 m de altitud (Mendoza et al; 2006).

2.8.6 Familia Passifloraceae

Plantas herbáceas o leñosas, perennes, trepadoras, con zarcillos axilares, raramente erectas y sin zarcillos. Hojas alternas simples, rara vez compuestas; pecíolos, a menudo con nectarios; estípulas presentes. Inflorescencias axilares, usualmente junto a un zarcillo terminal o colateral, a veces reducidas a un pedúnculo unifloro (Deginani, 1999).

La Familia cuenta con alrededor de 18 géneros y 630 especies, distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. De estos géneros 5 crecen en el Nuevo mundo, de los cuales son 4 son exclusivamente americanos mientras que el género *Passiflora*, tiene alrededor de 400 especies distribuidas tanto en el nuevo y viejo mundo.

El género *Passiflora* se considera como el más evolucionado dentro de la familia, puesto que el resto de ellos incluye árboles o arbustos carentes de zarcillos, algunos con espinas y androceo con mayor número de estambres.

2.8.7 Familia Piperaceae

Esta familia está conformada por 5 géneros y aproximadamente 3615 especies a nivel mundial. Dentro de las *Piperaceae* se encuentran hierbas, arbustos, subarbustos, pequeños árboles, menos frecuentemente trepadoras. La familia apenas se extiende más allá de los trópicos, generalmente viven en áreas húmedas. En el Neotrópico la familia se encuentra especialmente bien representada en los bosques andinos de media a baja elevación y es poco común en la selva tropical de la Amazonia central. La mayoría de las especies de *Piper* y *Pothomorphe* prefieren hábitats perturbados y muchas especies de *Peperomia* son epífitas (Davis et al., 2010).

Son utilizadas como especias: pimienta negra y blanca (frutos de *Piper nigra*), como ornamental (*Peperomia*). También se la utilizan para la fabricación de la bebida Kava (*Piper methysticum*) y en medicina popular (*Piper*).

2.8.8 Familia Rubiaceae

Rubiaceae es una familia cosmopolita, pero con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Es una de las más diversas al nivel mundial, con alrededor de 10.700 especies. Algunas se extienden hacia regiones templadas y aún frías, pero están completamente ausentes en la región ártica.

La familia *Rubiaceae* está representada en Colombia por 105 géneros nativos que incluyen más de 960 especies. Con frecuencia se describen nuevas especies y en la mayoría de los trabajos florísticos aparece la familia *Rubiaceae* como una de las mejor representadas en cuanto al número de individuos y especies y es utilizada como indicador de biodiversidad. Presenta especies con importancia económica ya sea en la producción de tintes, sustancias medicinales, productos comestibles o maderables. En la literatura se ha encontrado que la familia *Rubiaceae* presenta en su composición fitoquímica saponinas, flavonoides, terpenos, esteroides, taninos y antraquinonas. (Cimanga et al., 2010).

Palicourea es un género neotropical con más de 200 especies que se distribuyen en Las Antillas y desde México hasta el norte de Argentina y sur del Brasil. Colombia es el país con mayor número de especies del género con cerca de 130, presentes en todas las regiones y altitudes hasta las zonas de páramo; su mayor diversificación se localiza en la región Andina entre los 1.000 y 2.000 m de altitud (Mendoza et al., 2004).

2.8.9 Familia Solanaceae

La familia *Solanácea* comprende unas 2500 especies de plantas esparcidas por todo el mundo, pero especialmente en América tropical, son fundamentalmente hierbas, árboles y arbustos.

Tienen hojas alternas, enteras o finamente lobuladas, sus tallos son erectos o tumbados y muchas veces trepadoras, Sus flores son de simetría radial, generalmente en formas de campana o copa, agrupadas en cimas solitarias.

La familia Solanaceae es reconocida mundialmente por su importancia en términos de vegetales cultivables y el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies con fines ornamentales y medicinales porque poseen alcaloides derivados del tropano (Carreño et al., 2007); por ejemplo, pueden biosintetizar la hiosciamina, atropina y escopolamina, entre otros compuestos alcaloidales. Estos compuestos pueden ser tóxicos pero a la vez son utilizados como sedantes. Géneros como *Solanum* poseen hojas muy ricas en gluco-alcaloides esteroidales derivados del solanidano y el espirosolano, frecuentemente tóxicos para el hombre y otros mamíferos por su potente acción hemolítica y por su efecto depresor sobre el sistema nervioso central y respiratorio, aunque en pequeñas dosis pueden usarse medicinalmente.

2 JUSTIFICACION

Las plantas siempre han sido de vital importancia para el hombre, supliendo necesidades básicas como alimento y medicina. Por tal razón, se han estudiado desde hace muchos años, demostrando sus grandes efectos biológicos en la salud humana; ya sea como reguladores, inhibidores enzimáticos, conservantes, entre otros (Raskyn et al., 2002). En Colombia existe una gran diversidad de plantas pertenecientes a diferentes familias, las cuales, pueden ser muy útiles como fuente de antioxidantes naturales.

Estudios recientes indican la implicación crucial del estrés oxidativo causado por el desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de oxidantes, en varias etapas de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson; además del cáncer, problemas cardiovasculares y desordenes inflamatorios (Miglior et al., 2009).

El ser humano necesita radicales libres para realizar procesos biológicos como lo es el transporte de electrones, la regulación de la presión sanguínea, el control de las infecciones (Buitrago et al., 2004); sin embargo, la acumulación excesiva de estos agentes en el organismo puede provocar daños en las células, originando degeneración de los tejidos, lo que conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades.

La manera más efectiva de evitar el daño producido por dichos radicales es su destrucción o estabilización por parte de antioxidantes (Ramírez et al., 2007). Debido a esto en los últimos años, el estrés oxidativo y sus efectos adversos en la salud humana ha llegado a ser un tema de alto interés en los campos biológico, medicinal, nutricional y agroquímico (Magalhães et al., 2008); adicionalmente, la búsqueda y obtención de antioxidantes como alternativas de origen natural para sustituir a los antioxidantes sintéticos debido a sus efectos nocivos para el hombre y el medio ambiente.

Es por toda esta problemática que este proyecto se centrará en el estudio de la actividad antioxidante de 30 especies pertenecientes a 10 familias de plantas, recolectadas en la Ecorregión Cafetera entre las que se encuentran: Apiaceae, Apocynaceae, Asclepidaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Passifloraceae, Piperaceae, Rubiaceae y Solanaceae. Aquellos extractos de especies de plantas que presenten actividad antioxidante significativa, podrían considerarse como una alternativa natural que reduciría o retrasaría la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS); mencionando que sería una gran riqueza como flora por su actividad además de la gran perspectiva económica que ofrecería por ser autóctona de nuestro país.

3 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante de 30 plantas pertenecientes a las familias Apiaceae, Apocynaceae, Asclepidaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Passifloraceae, Piperaceae, Rubiaceae y Solanaceae recolectadas en las zonas de reserva de la Ecorregión Cafetera.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antioxidante de los extractos de metanol y diclorometano a través de los métodos de captura de electrones DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y ABTS^{•+} (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).
2. Establecer el contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu de los extractos con una actividad antioxidante mayor o igual al 25% a través de DPPH.
3. Cuantificar el contenido de flavonoides de los extractos con actividad antioxidante superior o igual al 25%.
4. Determinar el perfil cromatográfico de los extractos con actividad antioxidante superior al 25% por HPLC-DAD.

5. METODOLOGIA

5.1 MATERIALES

5.1.1 Reactivos

Radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*) con pureza del 99.9%, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (TROLOX), ácido gálico y ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) fueron Sigma-Aldrich; reactivo de Folin - Ciocalteu, hidróxido de sodio y el control positivo Hidroquinona fueron Merck.

En el trabajo por HPLC se utilizaron solventes (metanol, acetonitrilo, isopropanol) grado HPLC Mallinckrodt (Kansas City, Missouri, USA) y una columna octadecilsilano C₁₈ Supelco (St. Louis, Missouri, USA).

Para el resto de procesos los solventes orgánicos empleados, metanol, etanol y diclorometano fueron Mallinckrodt de grado analítico.

5.1.2 Materiales y equipos

- Balanza analítica Ohaus Adventure (New Jersey, USA).
- Refrigerador para el almacenamiento de productos químicos LC Electronics (New Jersey, USA).
- Micropipetas fueron Eppendorf de presión de 0-10, 10-100 y 100-1000 µL (Hamburgo, Alemania).
- Material de vidrio Schott-Duran (Tirschenreuth, Alemania).
- Lector de microplacas Multiskan go Thermo scientific (Vantaa, Finlandia).
- HPLC analítico Agilent 1100 (California, USA).
- Rotaevaporador laborata 4000 Heidolph (Bayer, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-Vis light 5X Schott Instruments (Tirschenreuth, Alemania).

5.1.3 Material vegetal

En la tabla 3 se presentan las plantas recolectadas en las zonas de estudio (Reserva Natural Bremen-La Popa y el Parque Regional Natural Ucumarí) y el número del voucher FJR de identificación (código del herbario de la Universidad de Antioquia).

5.2 Preparación de las muestras

La parte aérea de las plantas en estudio (Ver tabla 3) se secaron en un horno a 50°C, se maceraron y se extrajeron por maceración pasiva, procedimiento mediante el cual se obtuvieron los extractos de metanol y diclorometano a evaluar. La preparación de las muestras (extractos) se realizó según el procedimiento descrito en la figura 14 para cada uno de los ensayos de determinación de la capacidad antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+}).

La disolución de los extractos vegetales en metanol se realizó por medio del sistema Metanol-agua-etanol (6:2:2 v/v) y los extractos en diclorometano a través del sistema etanol-butanol-agua (2:6:2 v/v)

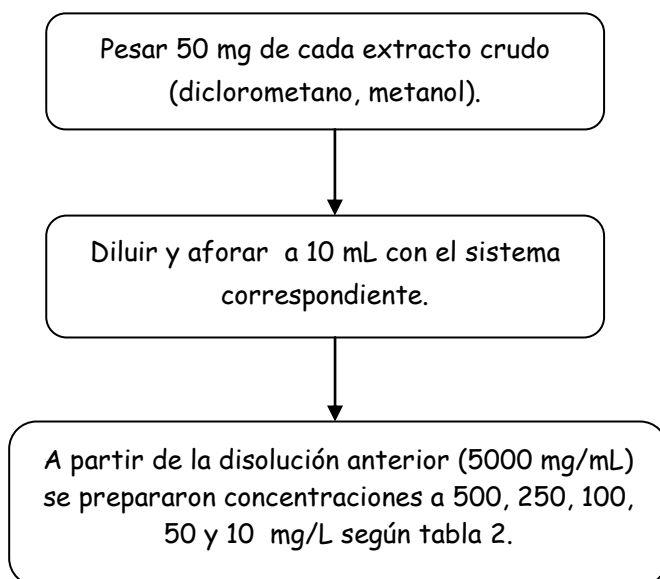


Figura 14. Protocolo para la preparación de las muestras.

Tabla 3. Plantas recolectadas en las diferentes zonas de reserva de la región cafetera.

FAMILIA	ESPECIE	CÓDIGO	
		FJR (Voucher)	UTP
Apiaceae	<i>Arracacia elata</i>	4001	153
Apocynaceae	<i>Mandevilla veraguensis</i>	3955	200
Asclepidaceae	<i>Blepharodon bifidus</i>	3999	151
	<i>Blepharodon grandifolium</i>	4055	201
Rubiaceae	<i>Palicourea petiolaris wemh</i>	3182	28
	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	3183	29
	<i>Palicourea thyrsiglora (Ruiz & Pav) DC.</i>	3184	30
Piperaceae	<i>Peperomia acuminata</i>	4002	154
	<i>Piper crassinervium</i>	4030	175
	<i>Piper glanduligerum</i>	4026	172
	<i>Piper calceolarium</i>	4048	194
	<i>Piper Daniel-gonzalezii</i>	4051	197
Solanaceae	<i>Witheringia coccoloboides</i>	4019	165
	<i>Cestrum humboldtii</i>	4022	168
	<i>Browallia speciosa</i>	4025	171
	<i>Solanum ovalifolium</i>	4027	173
	<i>Solanum brevifolium</i>	4028	174
	<i>Solanum acerifolium</i>	4053	199
Melastomataceae	<i>Tibouchina</i>	4040	185
	<i>Topobea cf discolor</i>	4009	160
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	4050	196
	<i>Alchornea grandis</i>	4056	202
Passifloraceae	<i>Passiflora apoda</i>	3988	141
	<i>Passiflora antioquiensis</i>	4000	152
	<i>Passiflora rubra</i>	4038	183
	<i>Passiflora danielli</i>	4037	182
Clusaceae	<i>Clusia multiflora</i>	4006	157
	<i>Tovomita guianensis</i>	4008	159
	<i>Vismia laevis</i>	4039	184
	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	4035	180

A partir de la solución stock se tomaron las respectivas alícuotas, necesarias para preparar concentraciones de 500, 250, 50, 10 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos y/o muestras, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de dilución a partir de la solución stock.

Vol. Solución stock (μL)	Vol. del aforo (mL)	Concentración final del extracto ($\mu\text{g/mL}$)
500	5	500
250	5	250
100	5	100
50	5	50
10	5	10

5.3 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH \cdot .

5.3.1 Preparación de la solución de DPPH \cdot

Para cada ensayo se preparó en un matraz completamente cubierto en papel aluminio la solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH \cdot) a 20 mg/L en metanol grado analítico. El volumen a preparar dependía de la cantidad de muestras a evaluar y subsiguientemente se transfirió a un frasco ámbar cubierto con papel aluminio para evitar su rápida degradación.

5.3.2 Capacidad captadora del radical DPPH \cdot (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo)

La determinación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos vegetales se llevó a cabo de acuerdo con el método Brand-Willians et al., (1995), con ligeras modificaciones como se describe en la figura 15. Cada ensayo se realizó 2 veces y su vez cada muestra por triplicado (Murillo et al., 2007).

Se realizó un tamizaje a una concentración de $1000\ \mu\text{g/mL}$ para determinar la actividad antioxidante de cada extracto con el objetivo de descartar aquellos que a dicha concentración no presentaran un porcentaje de actividad antioxidante mayor o igual a 25% y por tanto no se consideraban activos en este trabajo. Para esto se siguió el protocolo descrito en la figura 15.

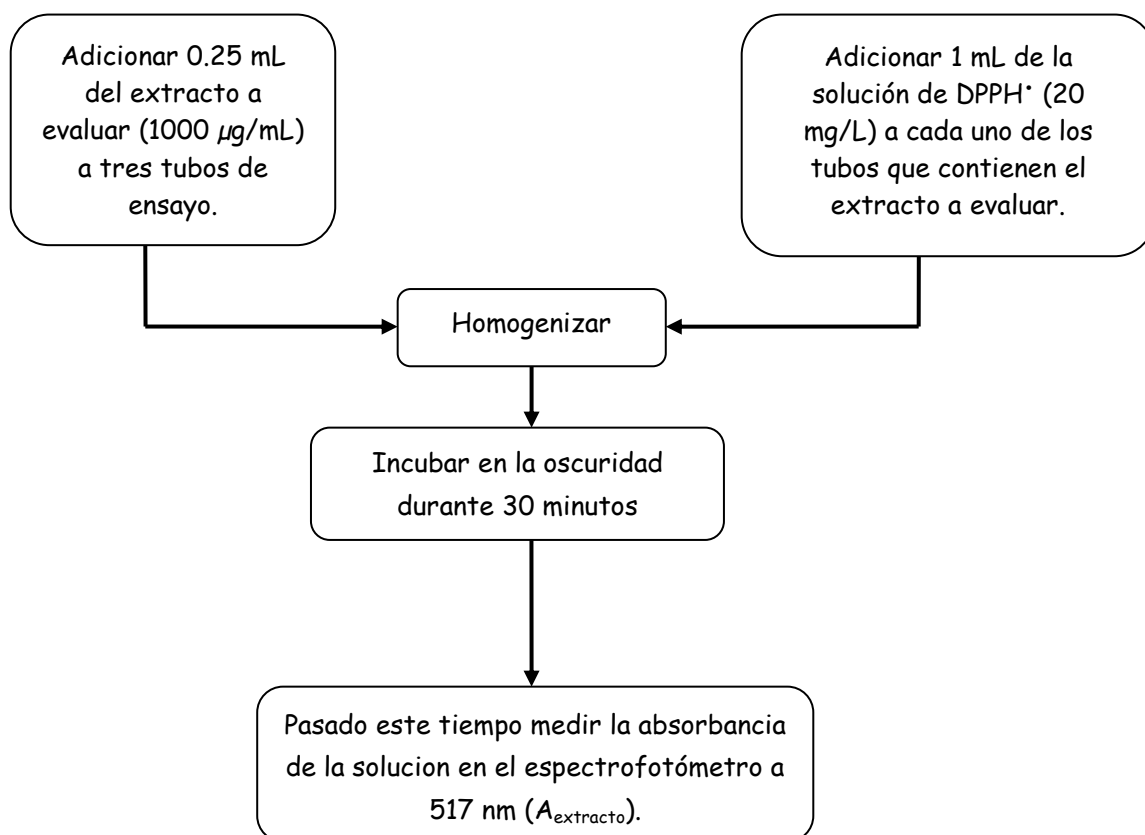


Figura 15. Método para evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH• (Murillo et al., 2007).

Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona a una concentración de $1000\ \mu\text{g/mL}$; como control negativo ($A_{\text{Control}} (-)$) se tomó el sistema de disolución correspondiente según cada caso. Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo usado para los extractos (figura 15). Además se midió el control fotométrico preparado a partir de 1.25 mL de metanol para descartar la absorbancia de este solvente en las mediciones.

El blanco de los extractos fué preparado a partir de 0.25 mL del extracto en análisis y 1 mL de metanol. Esta solución fue medida a una longitud de onda de 517 nm ($A_{\text{Blanco extracto}}$).

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antioxidante con la ecuación que se presenta en la figura 16 (Murillo et al., 2007):

$$\% \text{Actividad Antioxidante} = \left[\frac{A_{\text{control}(-)} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Figura 16. Ecuación para calcular el porcentaje de actividad antioxidante de los extractos para el ensayo DPPH[•].

Donde:

A_{Extracto} : Absorbancia de los extractos.

$A_{\text{Blanco extracto}}$: Absorbancia del blanco de los extractos.

$A_{\text{Control}(-)}$: Absorbancia del control negativo.

Luego de descartar aquellos extractos con un porcentaje de actividad antioxidante menor al 25%, se prepararon concentraciones de 500, 250, 100, 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$, (ver tabla 4), a partir de cada uno de los extractos activos a 1000 $\mu\text{g/mL}$, a los cuales se les determinó su actividad antioxidante mediante el mismo protocolo seguido para realizar el tamizaje (figura 15).

Posterior al cálculo de los porcentajes de actividad antioxidante para cada una de las concentraciones, se determinó la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}) mediante una regresión en el programa estadístico GraphPad Prims.

5.3.3. Capacidad antioxidante en equivalentes trolox

La capacidad antioxidante en equivalentes trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de la solución de trolox que tiene la misma capacidad captadora de radicales libres que el extracto. Con el objeto de comparar los resultados de capacidad antioxidantes de los extractos vegetales que se obtuvieron mediante los diferentes métodos (DPPH• y ABTS^{•+}) se realizó una curva estándar del antioxidante de referencia Trolox, con concentraciones desde 1 μ M hasta 32 μ M usando etanol absoluto como solvente. De allí, se obtuvo una ecuación de correlación con la cual se entregan su correspondiente equivalencia en trolox según el porcentaje de actividad antioxidante obtenido. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.4 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

5.4.1 Generación de radical catión ABTS^{•+}

La solución del radical catión ABTS^{•+} solo es estable durante máximo dos días; por tal razón, se preparaban 5 mL de solución para cada ensayo y se ajustaba la absorbancia a $0.7 \pm (0.02)$ diluyendo con etanol analítico a una longitud de onda de 732 nm. El protocolo para la preparación de la solución de ABTS^{•+} se describe en la figura 17 (Re et al., 1999).

5.4.2 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método del ABTS^{•+}

De acuerdo con lo planteado previamente, se analizaron aquellos extractos que se consideraron activos (%AA mayor a 25%) a una concentración de 1000 mg/L en el ensayo del DPPH• y se evaluaron a diferente concentración para la determinación posterior del IC₅₀ en el ensayo del ABTS^{•+}. Cada ensayo se

realizó dos veces y a su vez cada muestra se evaluó por triplicado. (Ver tratamiento de la muestra en la figura 14).

La actividad inhibidora del radical catión $ABTS^{•+}$ sobre los extractos en estudio se midió de acuerdo al método descrito por Re et al., (1999) y Mathew et al., (2005) con algunas modificaciones referidas a las concentraciones en los extractos. Dichas modificaciones están incluidas en el procedimiento descrito en la figura 18.

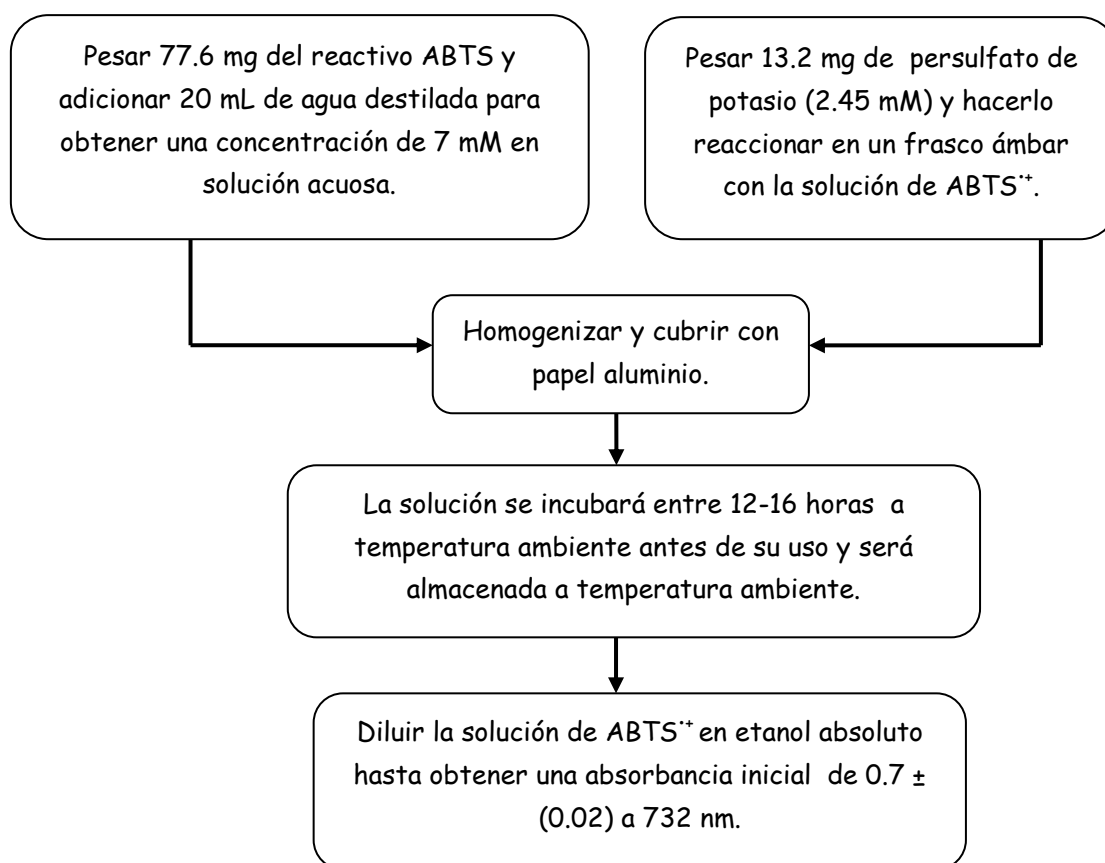


Figura 17. Protocolo para la generación del radical catión $ABTS^{•+}$ (Re et al., 2009).

Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona ($1000 \mu\text{g/mL}$), como control negativo ($A_{\text{Control}} (-)$) se usó el sistema de disolución correspondiente según cada caso. Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo

utilizado en la medición de los extractos. Adicional a estos se midió el control fotométrico preparado a partir de 2 mL de etanol-agua (1:1) para descartar la absorbancia de el solvente en las mediciones.

El blanco de los extractos se preparó a partir de 50 μL del extracto y 1450 μL de la mezcla de agua y etanol (1:2). Esta solución fue medida a una longitud de onda de 732 nm ($A_{\text{Blanco extracto}}$).

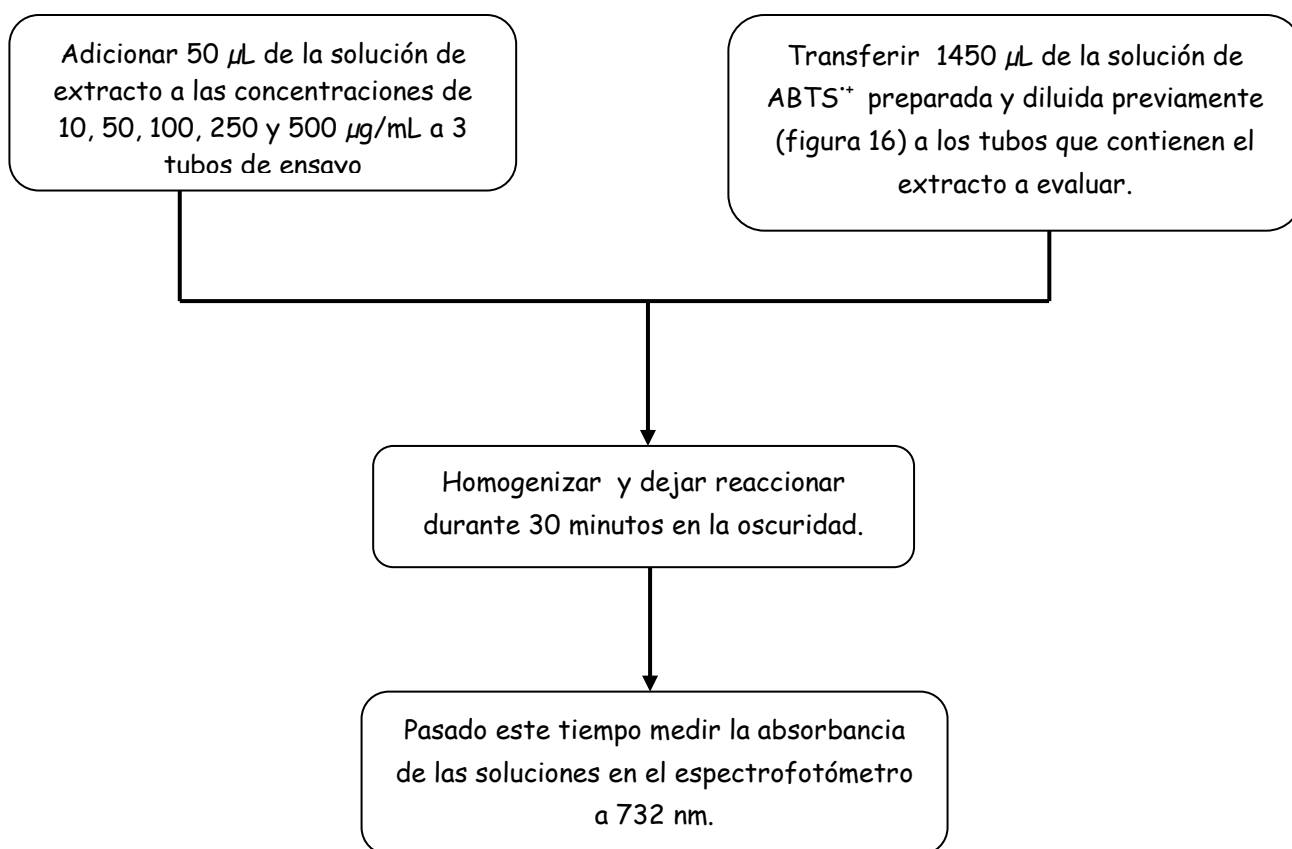


Figura 18. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS $^{\bullet+}$ (Mathew et al., 2005)

La capacidad captadora de radicales libres (porcentaje de actividad antioxidante) se calculará mediante la misma ecuación por medio de la cual se halló en el ensayo DPPH $^{\bullet}$ (ver figura 16).

El IC_{50} se halló de la misma manera que en el ensayo DDPH; a partir de los porcentajes de actividad antioxidante determinados y mediante regresión lineal en el programa graphpat primis. Los equivalentes TROLOX se hallaron a partir la curva estándar y del porcentaje de actividad antioxidante obtenido para cada concentración de los extractos vegetales.

5.5 Determinación de fenoles totales

Este ensayo fue realizado en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO (Vantaa, Finlandia), usando una detección espectrofotométrica y una placa de 96 pozos. Se siguió el método descrito por Magalhães et al., (2010) con algunas modificaciones; el reactivo de Folin-Ciocalteu se diluyó 1:50 (v/v) debido a que con la dilución mencionada por el autor (1:5), el valor final de la absorbancia no se ajustaba los rangos de medición (0.2-0.8) dicho protocolo se muestra en la figura 19.

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 8, 16 mg/L. Dichas concentraciones son relativamente bajas, esto debido a que el alcalí (NaOH) con el que se está trabajando es una base muy fuerte y logra formar un complejo muy coloreado a pesar de que su concentración no sea muy alta, consecuentemente, los extractos también se midieron a una concentración baja de 50 mg/L.

Como control negativo ($A_{Control}$ (-)) se tomó el sistema de disolución correspondiente según cada caso y se midió siguiendo el mismo protocolo utilizado en la medición de los extractos. Adicional a estos se midió el control fotométrico preparado a partir de 200 μ L de etanol-agua (1:1) para descartar la absorbancia de el solvente en las mediciones.

El blanco de los extractos se preparó a partir de 50 μ L del extracto y 150 μ L de agua. Esta solución fue medida a una longitud de onda de 760 nm (A_{Blanco} extracto).

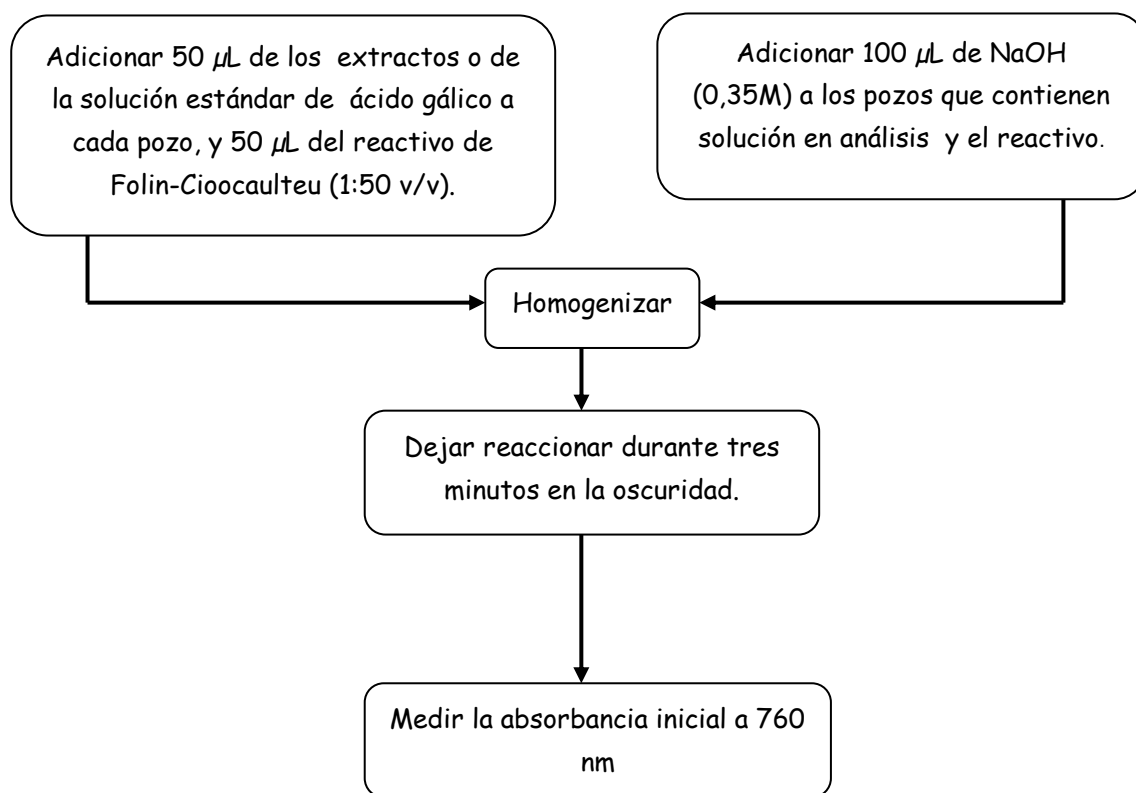


Figura 19. Protocolo para la determinación de fenoles totales en las muestras de extractos vegetales (Magalhães et al; 2010).

5.6 Identificación y Determinación de flavonoides espectrofotométricamente

5.6.1 Determinación de flavonoides totales

Este método se basa en la reacción entre los grupos OH de los flavonoides y el aluminio (Al^{+3}) formando un complejo rosado que se mide espectrofotométricamente en la región de los 500 nm. El ensayo fue realizado usando detección espectrofotométrica en una placa de 96 pozos siguiendo el método descrito por Kim et al., (2003) con algunas modificaciones; el protocolo se muestra en la figura 20.

Se prepararon varias soluciones antes de empezar con el protocolo:

- Solución $NaNO_2$ 5%: 200 mg de $NaNO_2$ en 4 ml de agua.

- Solución de AlCl_3 al 10%: 400 mg de AlCl_3 en 4 mL de agua.
- Solución NaOH 1M: 4g de NaOH en 100 mL de agua.

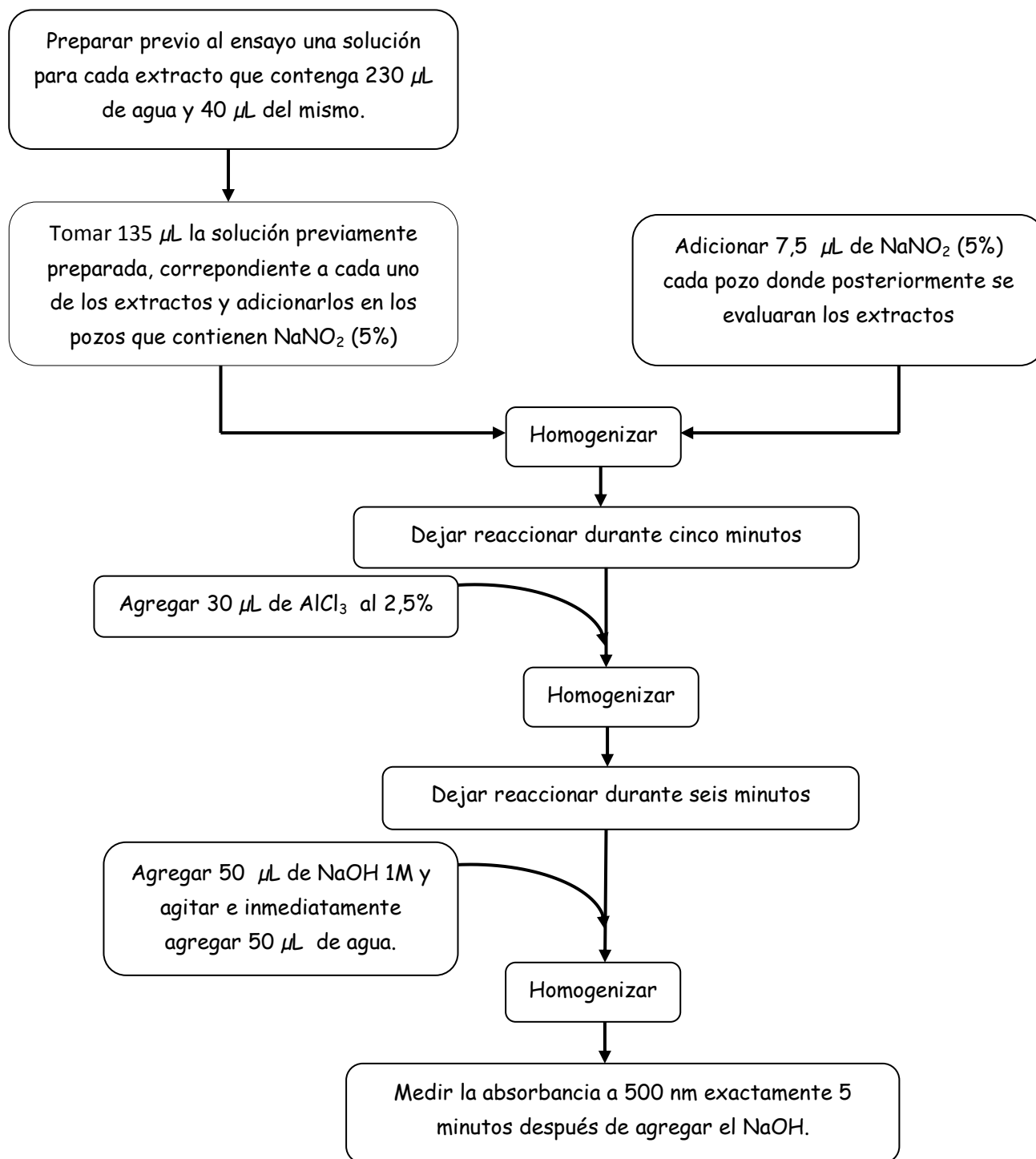


Figura 20. Protocolo para la determinación de flavonoides totales en las muestras de extractos vegetales (Kim et al; 2003).

Se realizó una curva de calibración de Kaempferol a las siguientes concentraciones: 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/L a partir de una solución stock de 1 mg/mL.

5.6.2 Separación e identificación de flavonoides por HPLC

Para la separación cromatográfica se escogieron los extractos vegetales que presentaron un porcentaje de actividad antioxidante mayor al 25%, preferiblemente en ambos extractos (metanol y diclorometano), pero que además pertenecieran a la misma familia para poder utilizar condiciones similares.

Se siguió el protocolo descrito por Maškovi et al., (2012) con algunas modificaciones. Se utilizó un equipo HPLC Agilent 1100. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna Hypersil ODS (5 μ m, 250 x 4 mm), se usó un detector de arreglo de diodos (DAD) a 280, 330 y 350 nm, con un ancho de banda de 4nm y una longitud de referencia de 500/100; operado con el programa ChemStation versión B04A. Se inyectaron 20 μ L de cada muestra para una concentración final de 5000 μ g/mL.

El gradiente de elución que se empleó para los extractos de metanol (UTP 157, 159, 160) se llevó a cabo variando la proporción del solvente A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%) así: 0-2 min 100% de B a 1 mL/min, 2-6 min 73% de B, 6-10 min 48% B a 0.4 mL/min, 10-20 min 48% B, 20-22 min 40% B, 22-24 30% B a 1 mL/min, 24-32 20% B y 32-40 0% A. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 40 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C (sistema 1).

Para el extracto de diclorometano UTP 157 se utilizó el siguiente gradiente en proporciones del solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% B a 1mL/min, 2-6 min 50% B, 6-10 min 20% B, 10-12 min 10% a 0,4 mL/min, B 12-20 min 10% B, 20-25 min 0% B a 1mL/min, 25-30 min 0% A.

El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 30 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C (sistema 2).

Para el extracto de diclorometano UTP 159 se utilizó el siguiente gradientes en proporciones del solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 80% B, 2-6 min 60% B, 6-16 min 20% B, 16-40 min 10% B 40-55 min 50% B, con flujo de 0,4 mL/min. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 55 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C (sistema 3).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Determinación del porcentaje de la actividad antioxidante de los diferentes extractos de metanol y diclorometano de plantas de la Ecorregión Cafetera Colombiana

6.1.1 Ensayo DPPH

6.1.1.1 Condiciones preliminares para el ensayo DPPH

Para determinar la actividad antioxidante por el ensayo DPPH[•], el rango de longitudes de onda varía entre los 515 y 540 nm (Murillo et al., 2007); para este trabajo se midió a 517 nm donde presenta su máxima absorción. La solución de DPPH[•] se preparaba minutos antes de realizar el ensayo, debido a que tiende a degradarse rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Molyneux, 2004).

6.1.1.2 Determinación de la actividad antioxidante (AA) por el método del DPPH[•]

A través de un tamizaje de la actividad antioxidante de los extractos de diclorometano y metanol a 1000 ppm de las plantas de la ECC (ver tabla 1, pag 35), se consideraron como extractos activos, aquellos que presentaron un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25%; valor que se usó como referencia considerando que equivale a la mitad de la actividad antioxidante presentada por la hidroquinona, utilizada como control positivo.

En la figura 21 se muestran los porcentajes de actividad antioxidante correspondientes a los 30 extractos metanólicos evaluados (anexo 1), de los cuales 15 presentaron un %AA superior al 25%. En el caso de los extractos de diclorometano solo 5 presentaron un %AA mayor al 25 (anexo 2) como se muestra en la figura 22.

Estos resultados concuerdan con lo planteado por Kang et al., (2003), teniendo en cuenta que la actividad antioxidante depende del tipo y la polaridad del solvente y que los solventes mas polares fueron los que presentaron la mayor actividad antioxidante (Kang et al.,2003).

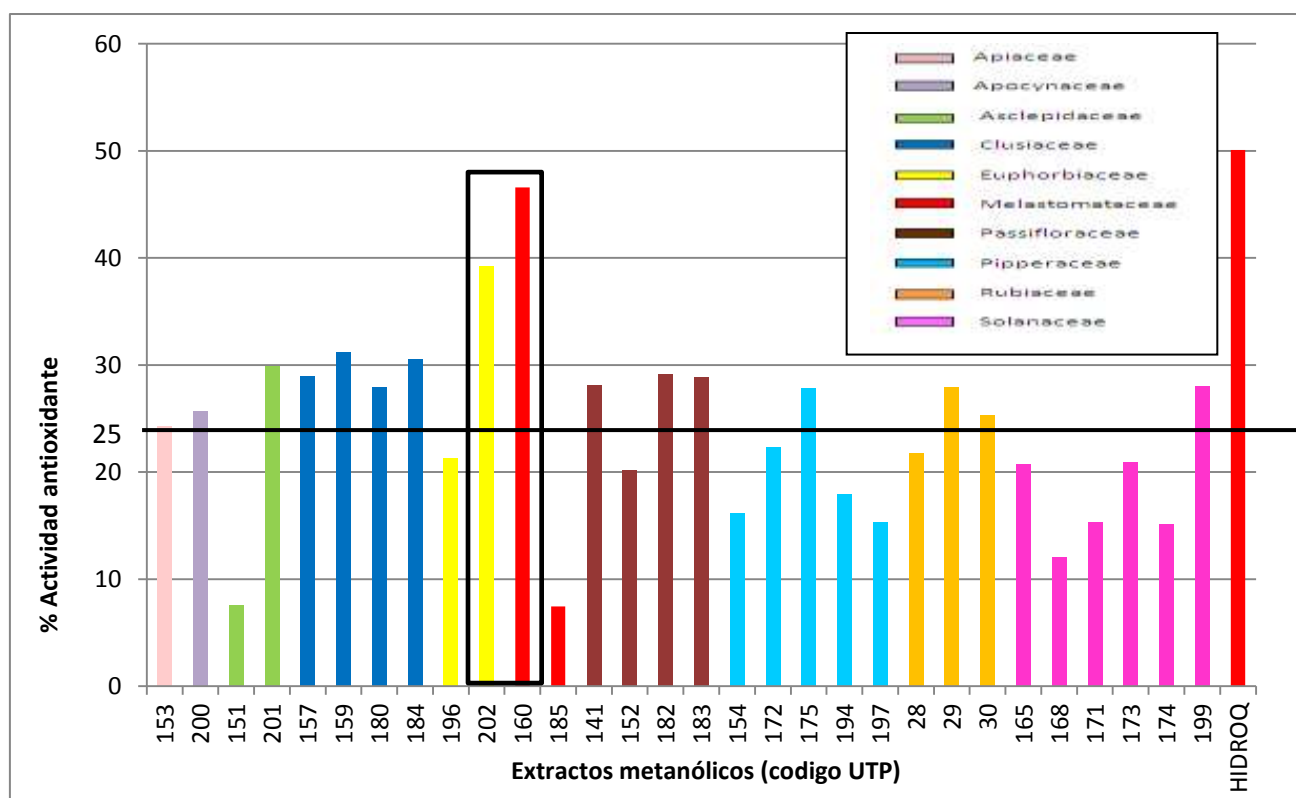


Figura 21. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las 30 plantas evaluadas por el ensayo DPPH*.

Como se muestra en la figura 21, para los extractos metanólicos, las especies con mayor actividad fueron *Topobea cf discolor* (UTP 160, *Melastomataceae*) Y *Alchornea grandis* (UTP 202, *Euphorbiaceae*) con valores de 46,58% y 39,27% respectivamente.

Niño et al., (2009) determinaron la presencia de alcaloides, esteroides, triterpenos, saponinas, flavonoides, fenoles y taninos en la especie *Topobea cf discolor* (UTP 160), metabolitos secundarios a los cuales se le puede atribuir su alta actividad antioxidante (Hidalgo et al., 2010; Xu et al., 2010); además reportaron la capacidad antifúngica marcadaa contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* MORELET para la misma especie.

Así mismo, Mosquera et al., (2007) reportaron la presencia de esteroides, saponinas, triterpenos, flavonoides, fenoles y taninos en la especie *Alchornea grandis* (UTP 202); así como también presentó actividad contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari).

En el género *Alchornea* Osadebe et al., 2012 reportaron que el extracto de metanol de la *Alchornea cordifolia* (Africa) obtuvo por el ensayo DPPH[•] un porcentaje de inhibición de 77%, muy similar al del antioxidante ácido ascórbico. Del mismo modo, se hallaron en la literatura especies de la familia Euphorbiaceae pertenecientes a diferentes géneros con destacada actividad antioxidante; entre ellas, *Phyllanthus maderapatensis* y *phyllanthus amarus* con 48,90% y 38,67%, respectivamente (Kumaran et al., 2007), *Sauropus androgynus* con 52,45% (Basma et al., 2011).

Por otro lado se han demostrado diversas actividades biológicas para especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae; tales como, efectos hepatoprotectores (Bhattacharjee et al., 2007), actúan frente a problemas del hígado y vejiga, infecciones intestinales, diabetes y el virus de la hepatitis B (Kumaran et al., 2007) y además pueden tener efectos anticonceptivos (Nardi et al., 2007).

Los extractos de diclorometano de las plantas evaluadas que presentaron los porcentajes más altos de actividad antioxidante como se muestra en la figura 22 fueron *Tovomita guianensis* (UTP 159), *Clusia multiflora* (UTP 157) ambas pertenecientes a la familia Clusiaceae con valores de 54,97% Y 34,19% respectivamente y *Piper crassinervium* (UTP 175) con un valor de 32,5% perteneciente a la familia Piperaceae.

En la literatura la familia *Clusiaceae* se ha caracterizado por ser rica en metabolitos como xantonas, triterpenoides, flavonoides, lactonas y ácidos orgánicos; así como también en una serie de benzofenonas preniladas (Cuesta-Rubio et al., 2005). Puesto que los extractos de diclorometano activos pertenecen a esta familia de plantas su actividad antioxidante podría atribuirse a se dichos metabolitos.

En la figura 23 se puede observar que los extractos de metanol fueron mas efectivos frente al radical DPPH[•] comparados con los extractos de diclorometano, destacando las familias *Euphorbiaceae* y *Melastomataceae* por sus porcentajes de actividad antioxidante significativamente altos para los extractos metanólicos, como también la familia *Clusiaceae* para los extractos de diclorometano.

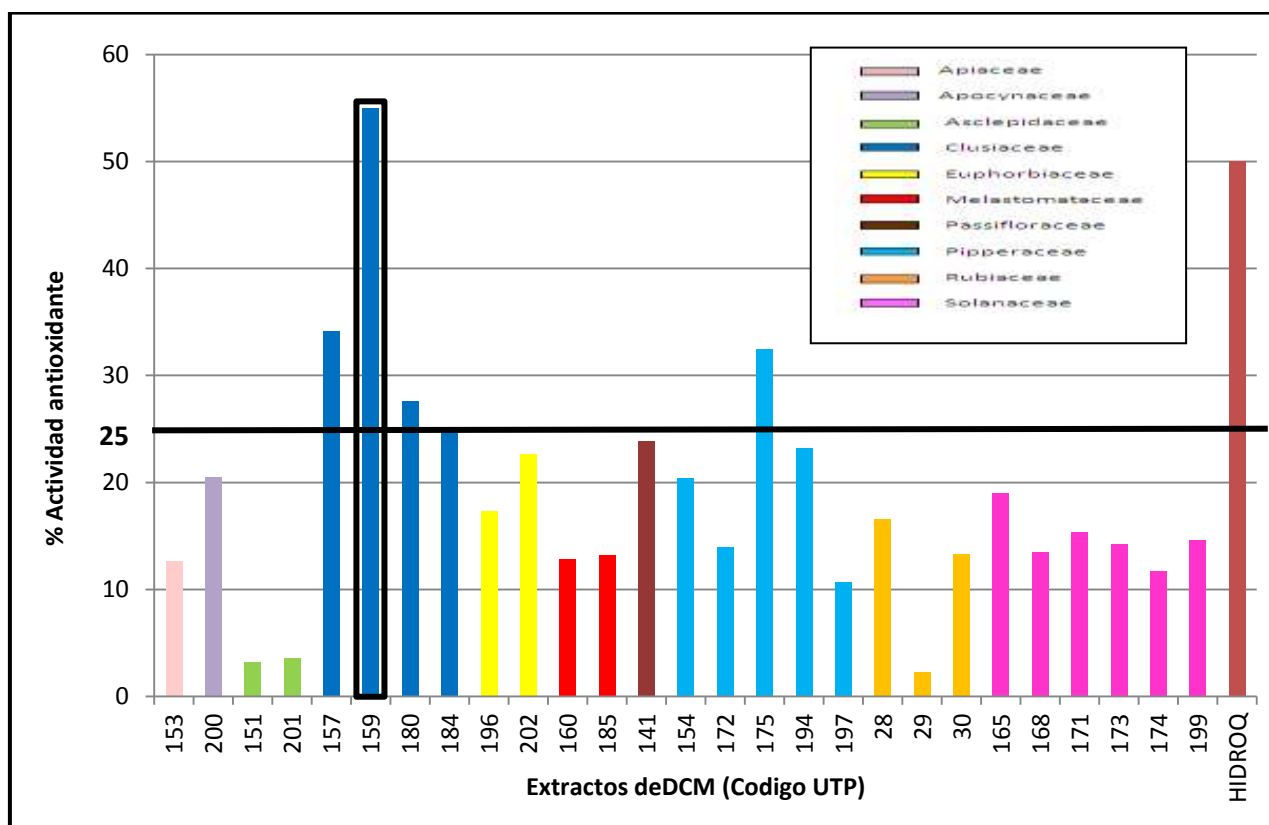


Figura 22. Porcentaje de actividad antioxidante en extractos en diclorometano de las 30 plantas estudiadas.

6.1.1.3 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀).

El IC₅₀ (μg/mL) mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica (Joshi et al., 2010). En este trabajo se midió la concentración de los extractos vegetales activos (%AA mayor al 25%) necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH[•], teniendo en cuenta que un IC₅₀ bajo, esta directamente asociado con una

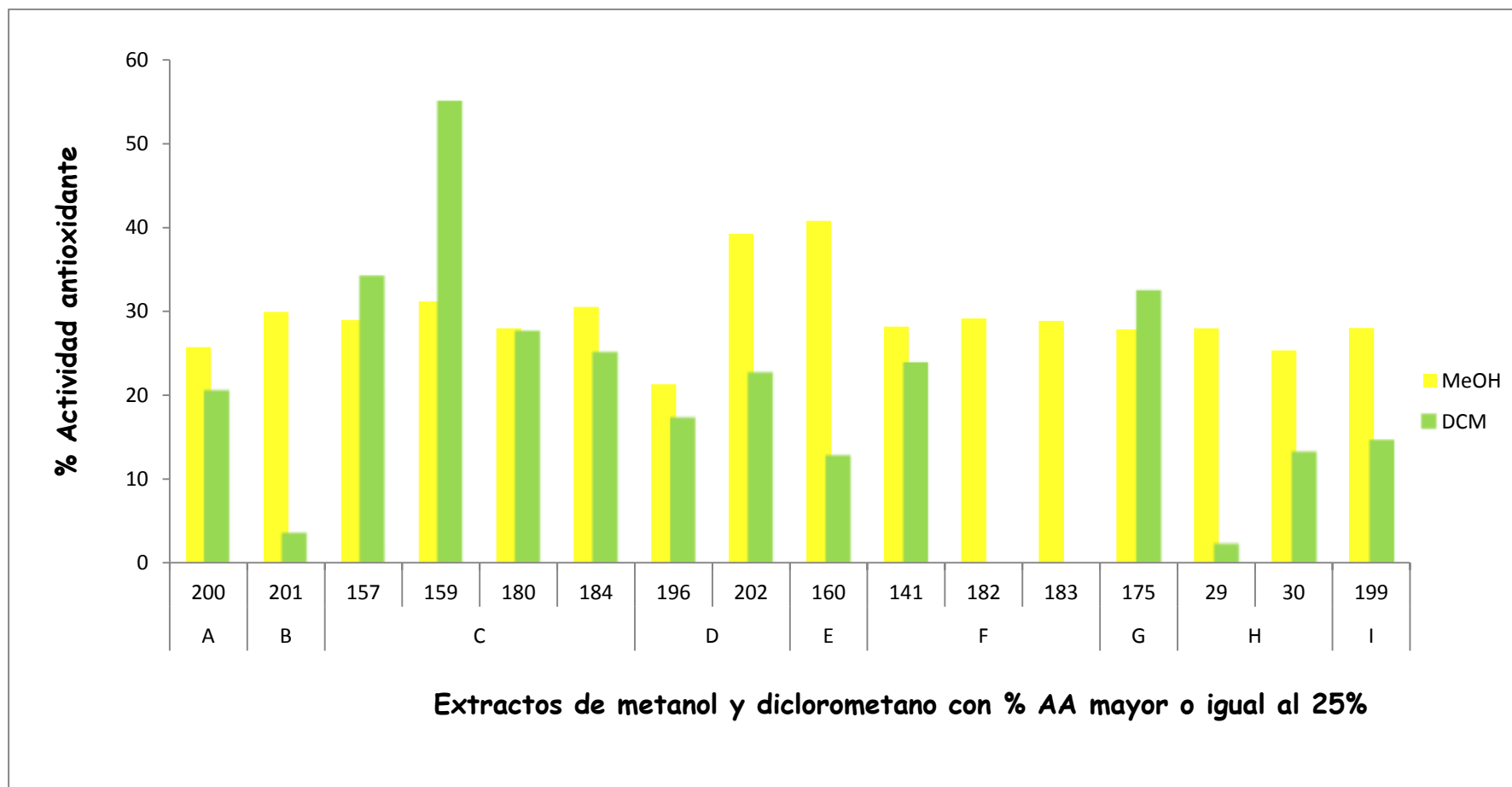


Figura 23. Porcentajes de actividad antioxidante para los quince extractos vegetales de metanol y cinco extractos vegetales de diclorometano que se consideraron activos (%AA mayor al "%%). (A: *Apocynaceae*, B: *Asclepidiaceae*, C: *Clusiaceae*, D: *Euphorbiaceae*, E: *Melatomataceae*, F: *Passifloraceae*, G: *Pipperaceae*, H: *Rubiaceae*, I: *Solanaceae*).

actividad antioxidante alta (Zhu et al., 2011). En otros trabajos se reportaron criterios de selección para extractos vegetales con base en el IC_{50} ; considerando de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 $\mu g/mL$, con moderado potencial ubicados en un rango entre 30 $\mu g/mL$ y 100 $\mu g/mL$ y de bajo potencial antioxidante aquellos con un IC_{50} por encima de 100 $\mu g/mL$ (Ramos et al., 2003).

Se determinó la concentración media inhibitoria de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{•+}$ (figura 14) de las plantas de la ECC, tanto para los extractos de metanol como de diclorometano que se mostraron activos. Los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos para cada extracto de metanol y diclorometano mediante el ensayo DPPH $^{\bullet}$ en sus diferentes concentraciones se presentan en los anexos 3 y 4.

En la tabla 5 se muestra el IC_{50} de la actividad antioxidante mediante el método DPPH $^{\bullet}$ para extractos metanólicos más activos.

La capacidad antioxidante de los extractos de metanol frente al radical DPPH $^{\bullet}$ medida en IC_{50} , varió entre 7,24 y 967,3 $\mu g/mL$. *Alchornea grandis* (UTP 202), especie que se mencionó previamente por su alto %AA mostró el IC_{50} mas bajo con una valor de 7,24 $\mu g/mL$, el cual indica un alto potencial antioxidante según la clasificación de Ramos et al., (2003). Entre tanto, en la literatura se encontró que el antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) presentó un IC_{50} de 11,5 $\mu g/mL$ (Trabelsi et al., 2012); al comparar este valor con el obtenido por el extracto metanólico de *Alchornea Grandis* se confirma destacada actividad y se puede inferir que este es un antioxidante natural promisorio.

Especies como *Tovomita guianensis* (UTP 159) y *Vismia laevis* (UTP 184) mostraron concentraciones de IC_{50} más altas con valores de 31,52 $\mu g/mL$ y 31,64 $\mu g/mL$ respectivamente; sin embrago se consideran también de alto potencial antioxidante, puesto que su concentración media inhibitoria es comparable con la reportada por Josh et al., (2010) para la quercetina, compuesto caracterizado por sus propiedades antioxidantes; con un valor de IC_{50} de 31 $\mu g/mL$.

Tabla 5. IC₅₀ de la actividad antioxidante para los extractos de metanol

Cod UTP	Nombre de la planta	Extractos de metanol Ensayo DPPH	
		%AA	IC ₅₀ (µg/ml)
29	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	27,98	137,6
30	<i>Palicourea thyrsigloria DC.</i>	25,36	65,1
141	<i>Passiflora apoda</i>	28,18	48,21
157	<i>Clusia multiflora</i>	28,96	70,81
159	<i>Tovomita guianensis</i>	31,18	31,52
160	<i>Topobea cf discolor</i>	46,58	49,18
175	<i>Piper crassinervium</i>	27,85	252
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	27,98	ND
182	<i>Passiflora danielli</i>	29,16	967,3
183	<i>Passiflora rubra</i>	28,88	45,08
184	<i>Vismia laevis</i>	30,53	35,64
199	<i>Solanum acerifolium</i>	28,02	141,3
200	<i>Mandevilla veraguensis</i>	25,73	54,01
201	<i>Blepharodon grandifolium</i>	29,95	298,1
202	<i>Alchornea grandis</i>	39,27	7,24
	Hidroquinona (control positivo)	50,08	-----

ND: No determinado

Las especies *Passiflora rubra* (UTP 183) con IC₅₀ de 45,08 µg/mL, *Passiflora apoda* (UTP 141) con IC₅₀ 48,21 µg/mL y *Topobea cf discolor* (UTP 160) con IC₅₀ 49,18 µg/mL mostraron un potencial antioxidante moderado con valores mas altos, sin embargo, no se alejan mucho del valor reportado previamente para la quercetina. Para el resto de los extractos vegetales activos se hallaron valores de IC₅₀ significativamente altos, esto puede inferir, no son muy eficientes como antioxidantes naturales.

En la tabla 6 se presenta el IC₅₀ de la actividad antioxidante mediante el método DPPH* para extractos de diclorometano más activos.

Para los extractos de diclorometano los valores de IC₅₀ variarán entre 47,11 µg/mL y 169,9 µg/mL, intervalo ligeramente alto comparado con los antioxidantes sintéticos y naturales mencionados previamente. *Chrysoclamys*

floribunda (UTP 180, *Clusiaceae*) mostró un IC₅₀ de 47,11 µg/mL, a pesar de que su porcentaje de actividad antioxidante no fue el mas destacado, obtuvo la concentración media inhibitoria mas baja. Por el contrario, *Tovomita guianensis* (UTP 159, *Clusiaceae*), especie que había obtenido un %AA muy significativo con un valor de 55% mostró un IC₅₀ de 71,09 µg/mL, valor alto con respecto a los criterios de selección. Esta contrariedad infiere que a pesar de su destacada capacidad antioxidante necesita gran cantidad de extracto para evitar la oxidación.

Tabla 6. % IC₅₀ de la actividad antioxidante para los extractos de diclorometano activos

Cod UTP	Nombre de la planta	Extractos de diclorometano Ensayo DPPH	
		%AA	IC ₅₀ (µg/ml)
157	<i>Clusia multiflora</i>	34,2	52,94
159	<i>Tovomita guianensis</i>	55,0	71,09
175	<i>Piper crassinervium</i>	32,5	169,9
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	27,6	47,11
184	<i>Vismia laevis</i>	25,1	195
	Hidroquinona (control positivo)	50,08	-----

Estos resultados concuerdan con Tepe et al., (2007) y Sarikurkcu et al., (2009), quienes mostraron que hay una fuerte correlación entre la polaridad de los extractos y su potencial antioxidante, siendo los extractos mas polares aquellos con un mayor potencial para capturar radicales libres y mostrando para los extractos de diclorometano una actividad antioxidante moderada con un IC₅₀ relativamente alto, lo cual genera una desventaja en la perspectiva de tomarlo como alternativa a un antioxidante sintético.

6.1.2 Ensayo ABTS^{•+}

6.1.2.1 Condiciones preliminares para el ensayo ABTS^{•+}

El ensayo ABTS^{•+} se basa en la transferencia de electrones; por lo cual los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos, donan uno o dos electrones para reducir el radical catión (figura 24), dando una medida precisa de la capacidad antioxidante total en el punto final de reacción (Wootton-Beard et al., 2011). La formación del radical catión ABTS^{•+} fue inducida mediante la adición del persulfato de potasio; se incubó durante 16 horas y se almacenó en la oscuridad, puesto que este es muy sensible a la luz y se degrada rápidamente. (Re et al., 1999).

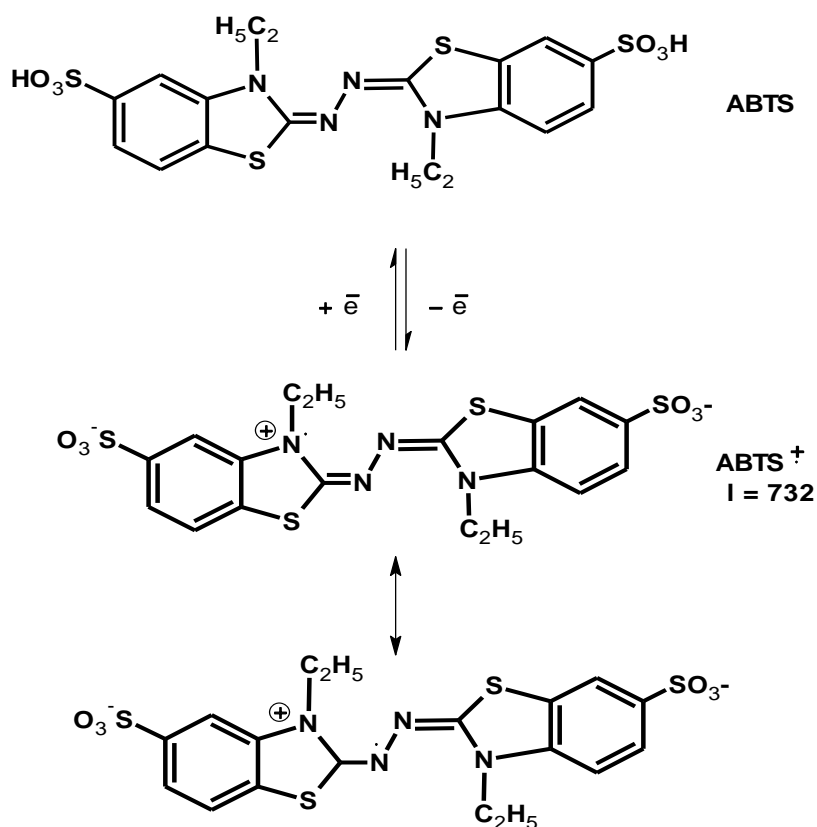


Figura 24. Estructura del ABTS y ABTS^{•+} radical catión (Osman et al., 2006).

6.1.2.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+}

Para este ensayo se midió el porcentaje de actividad antioxidante de cada extracto frente al ABTS^{•+} radical catión. Se analizaron solo aquellos extractos que se consideraron activos en el ensayo del DPPH[•] a las concentraciones de 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 5 y 6).

En la tabla 7 se presenta el IC_{50} de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} para los extractos de metanol activos y el porcentaje de actividad antioxidante obtenido a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 7. %AA por el ensayo ABTS^{•+} para cada extracto de metanol activo y su respectivo IC_{50} .

Cod UTP	Nombre de la planta	Extractos de metanol Ensayo ABTS ^{•+}	
		%AA (500 $\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
29	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	23,79	3588
30	<i>Palicourea thyrsigloria DC.</i>	16,51	478,9
141	<i>Passiflora apoda</i>	23,38	3466
157	<i>Clusia multiflora</i>	37,71	2032
159	<i>Tovomita guianensis</i>	31,93	1023
160	<i>Topobea cf discolor</i>	92,70	2886
175	<i>Piper crassinervium</i>	22,74	ND
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	35,72	1013
182	<i>Passiflora danielli</i>	19,09	2115
183	<i>Passiflora rubra</i>	18,01	ND
184	<i>Vismia laevis</i>	31,86	1865
199	<i>Solanum acerifolium</i>	21,85	ND
200	<i>Mandevilla veraguensis</i>	36,98	ND
201	<i>Blepharodon grandifolium</i>	38,16	536
202	<i>Alchornea grandis</i>	93,79	ND
	Hidroquinona (control positivo)	98,08	-----

ND: No determinado

Los porcentajes de actividad antioxidante para los extractos de metanol determinado mediante el ensayo ABTS^{•+} varían entre 16,51% y 93,79%.

También a través del método ABTS^{•+} las especies *Alchornea grandis* (UTP 202) y *Topobea c discolor* (UTP 160) obtuvieron los porcentajes de actividad antioxidante más destacados con valores de 93,79% y 92,70% respectivamente. La especie *Palicourea thyrsglora* (UTP 30) mostró el porcentaje de actividad antioxidante más bajo con un valor de 16,51%.

Los valores de IC₅₀ obtenidos varían entre 478,9 y 3588 µg/mL. Los valores mas bajos de IC₅₀ los presentaron *Palicourea thyrsglora* con 478,9 µg/mL y *Blepharodon grandifolium* con 536 µg/mL. Como se puede observar y basados en la clasificación de Ramos et al., (2003), son valores de IC₅₀ muy altos, que sobrepasan los 100 µg/mL y por ende clasifican como extractos de bajo potencial antioxidante.

Estos valores de IC₅₀ obtenidos podrían deberse al comportamiento cinético de los extractos durante la reacción y su relación con la manera en la cual se calcula el IC₅₀. Muchas evidencias experimentales han mostrado que hay una relación no-lineal entre la concentración del antioxidante y la concentración del radical DPPH[•] (Zheng et al., 2013) y como consecuencia de esto, la determinación del IC₅₀ se hace un poco mas compleja, puesto que en la regresión no-lineal deben tenerse en cuenta factores como el modelo de regresión que se a a utilizar y las opciones de ponderación.

En este trabajo la determinación de este parámetro (IC₅₀) se llevo a cabo a través del programa GraphPad Prism versión 5.01, tomando como modelo de regresión no-lineal log(dosis) vs respuesta, generandose una curva, ajustando por medio de minimos cuadrados los datos experimentales tanto como sea posible, hallando un modelo de ecuación adecuado (Zheng et al., 2013). Si en la reacción del antioxidante con el radical catión ABTS^{•+} el porcentaje de actividad antioxidante aumenta proporcionalmente al aumento de la concentración y no consigue un estado estacionario se puede inferir el valor IC₅₀ va a ser muy alto en el momento de hacer la regresión no-lineal lo cual podría explicar los valores obtenidos para los extractos vegetales por medio del ensayo ABTS^{•+}.

En la tabla 8 se presenta el IC_{50} de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} para los extractos de diclorometano activos y el porcentaje de actividad antioxidante obtenido a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 8. %AA por el ensayo ABTS^{•+} para cada extracto de diclorometano activo y su respectivo IC_{50} .

Cod UTP	Nombre de la planta	Extractos de diclorometano Ensayo ABTS ^{•+}	
		%AA (500 $\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
157	<i>Clusia multiflora</i>	48,2	374,5
159	<i>Tovomita guianensis</i>	31,7	ND
175	<i>Piper crassinervium</i>	32,3	4616
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	47,1	3822
184	<i>Vismia laevis</i>	15,4	1224
	HIDROQUINONA	98,08	----

ND: No determinado

Para los extractos de diclorometano evaluados a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, las especies *Clusia multiflora* (UTP 157) y *Chrysoclamys floribunda* (UTP 180) presentaron los porcentajes de actividad antioxidante más destacados con valores de 48,2%, 47,1%, respectivamente. La especie *Vismia laevis* (UTP 184) mostró el porcentaje de actividad antioxidante más bajo con un valor de 15,4%.

Al igual que para los extractos de metanol, estos mostraron un comportamiento muy similar, presentando con valores de IC_{50} muy altos mediante la determinación de la actividad antioxidante a través del ensayo ABTS^{•+}, que varían entre 374.5 $\mu\text{g/mL}$ para *Clusia multiflora* y 4616 $\mu\text{g/mL}$ para *Pipper crassinervium*.

6.2 Determinación de equivalentes trolox

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox) es un análogo del α -tocoferol soluble en agua. Es conocido por su alta capacidad antioxidante

y por tanto es utilizado como compuesto de referencia y actividad antioxidante es expresada como equivalentes trolox (Oehlke et al., 2011), principalmente para los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Para realizar comparaciones con otras investigaciones del porcentaje de captación de radicales libres es necesario unificar unidades para lo cual es utilizado usualmente el trolox (Arts et al., 2004), puesto que los protocolos seguidos por los diferentes investigadores para la determinación de la actividad antioxidante varían las condiciones (proporciones de los reactivos, concentraciones y tiempos de medición).

Por ello, se realizó una curva de calibración con trolox para el ensayo DPPH[•] (figura 25) con un coeficiente de correlación de R^2 : 0,9981 y otra para el ensayo ABTS^{•+} (anexo 7) con un coeficiente de correlación R^2 : 0,9971; a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y de diclorometano de las plantas de la EC evaluadas en μg Trolox/g de extracto. Los respectivos porcentajes de actividad antioxidante para cada concentración de trolox evaluada se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones trolox.

Concentración trolox (μM)	% AA
1	0
2	0,80
4	3,35
8	6,02
16	14,85
32	28,91

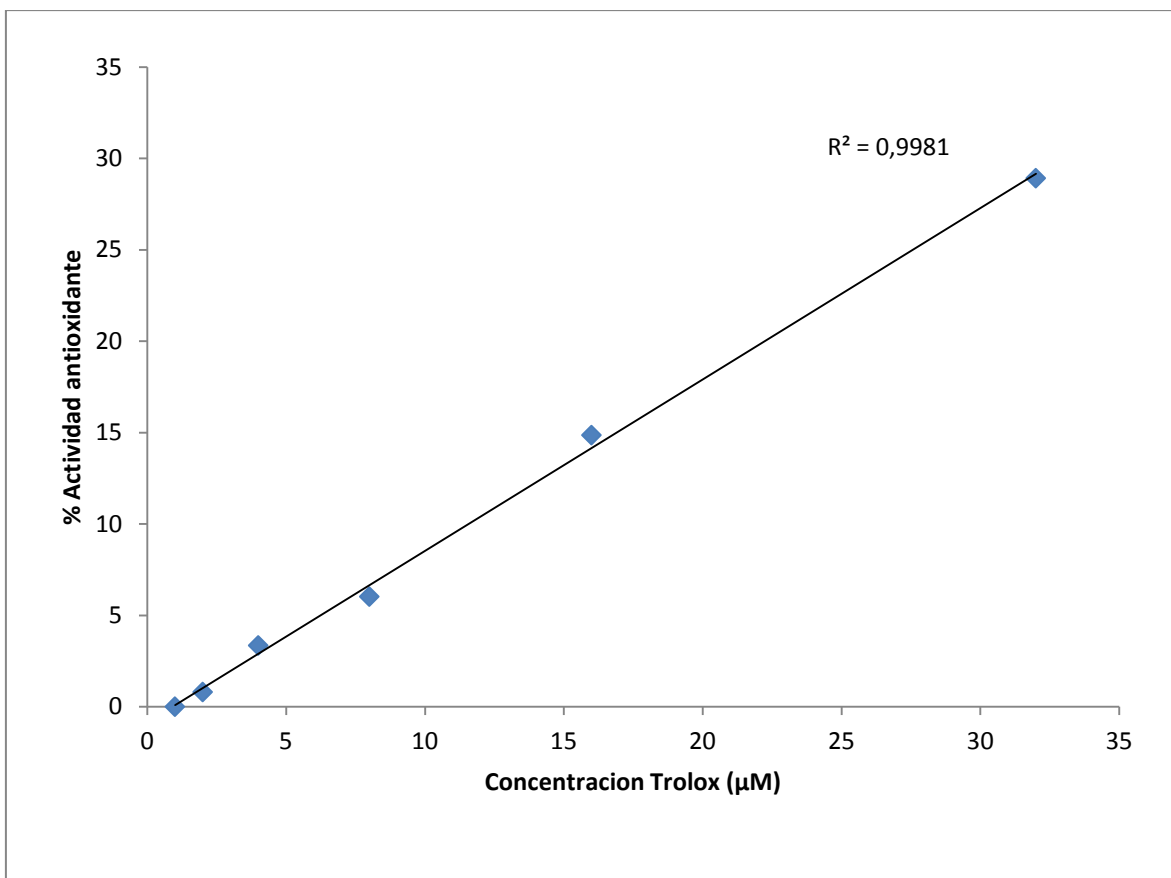


Figura 25. Curva de calibración trolox para el ensayo DPPH•.

En la tabla 10 se muestran la actividad antioxidante de los extractos de metanol activos, obtenidos mediante los ensayos de DPPH• y ABTS•• expresada en equivalentes trolox a una concentración de 500 µg/mL.

Para los extractos metanólicos evaluados por medio de los ensayos DPPH• y ABTS••, los rangos de concentración en equivalentes trolox varían desde 21,86 hasta 49,78 µg de trolox/g de extracto para el ensayo DPPH• y para el ensayo ABTS•• entre 145,23 y 852,0 µg de trolox/g de extracto.

Para el ensayo DPPH• se puede observar que las especies más destacada por sus concentraciones altas de equivalentes trolox son *Topobea cf discolor* (UTP 160) y *Alchornea grandis* (UTP 202) con valores de 49,78 y 44,06 µg de trolox/g de extracto, respectivamente.

Tabla 10. Concentración en equivalentes trolox de los extractos de metanol activos por los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

COD UTP	NOMBRE DE LA PLANTA	Equivalentes trolox (μg de trolox/g de extracto)	
		DPPH [•]	ABTS ^{•+}
29	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	27,01	212,72
30	<i>Palicourea thyrsigloria</i> DC.	27,01	145,23
141	<i>Passiflora apoda</i>	29,35	208,91
157	<i>Clusia multiflora</i>	32,89	341,84
159	<i>Tovomita guianensis</i>	29,49	288,27
160	<i>Topobea cf discolor</i>	49,78	852,00
175	<i>Piper crassinervium</i>	25,15	203,02
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	23,35	323,38
182	<i>Passiflora danielli</i>	25,25	169,16
183	<i>Passiflora rubra</i>	31,7	159,10
184	<i>Vismia laevis</i>	31,49	287,62
199	<i>Solanum acerifolium</i>	21,86	194,77
200	<i>Mandevilla veraquensis</i>	32,52	335,07
201	<i>Blepharodon grandifolium</i>	22,96	346,02
202	<i>Alchornea grandis</i>	44,06	862,11
	Hidroquinona (control positivo)	54,31	901,91

Para el ensayo ABTS^{•+}, las especies que presentaron las concentraciones más destacadas en equivalentes trolox al igual que para el ensayo DPPH[•] fueron *Topobea cf discolor* (UTP 160) y *Alchornea Grandis* (UTP 202) con valores de 852 y 862,11 μg de trolox/g de extracto, respectivamente.

Se encontró una alta correlación entre ambos ensayos (DPPH[•] y ABTS^{•+}), tal como se observó en otras investigaciones (Babbar et al., 2011 y Floegel et al., 2011), con un coeficiente de $R^2:0,7388$ (figura 26), lo cual muestra que los extractos evaluados tienen actividades comparables por ambos métodos y por tanto que estos son reproducibles al momento de medir la actividad antioxidante.

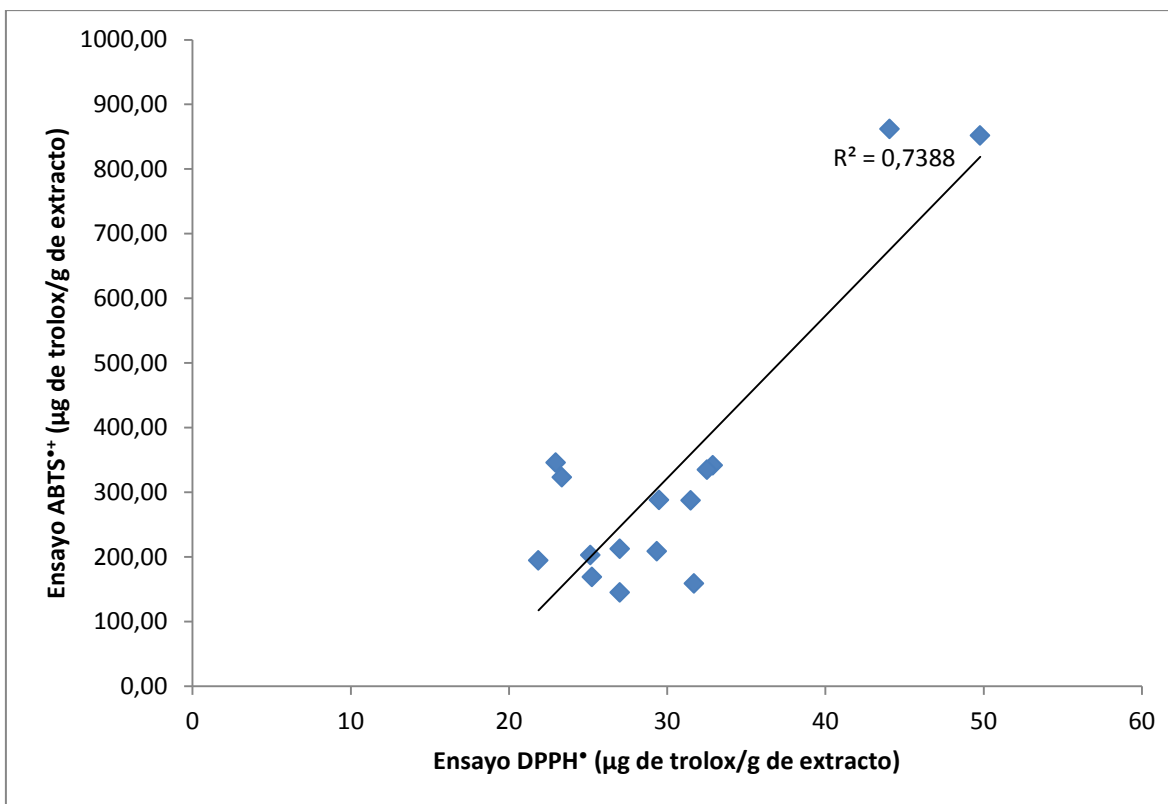


Figura 26. Correlación entre los equivalentes trolox de los extractos de metanol para los ensayos ABTS^{••} y DPPH[•]

Se observó también que mediante el ensayo ABTS^{••} se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante mucho más altos que por medio del ensayo DPPH[•], lo cual concuerda con datos reportados por Floegel et al., (2011). Hay algunas razones por medio de las cuales se podría dar explicación a este hecho, la primera se basa en la longitud de onda a la cual se realizaron las medidas para cada ensayo.

Para en el ensayo ABTS^{••} se tomó una longitud de onda de 732 nm, mientras que, para el ensayo DPPH[•] se midió a 517 nm. Desde la región del visible hay interferencias en la medición de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides que estén presentes en los extractos evaluados a 517 nm (Beserra et al., 2011).

Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH[•] con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir un antioxidante pequeño con mayor acceso

al radical mostrará mejora actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH[•] esta impedido estéricamente (Beserra et al., 2011). Por último, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH[•] con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Brand- Willians et al, 1997).

En la tabla 11 se relacionan los equivalentes trolox de los extractos de diclorometano activos, obtenidos mediante los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Tabla 11. Concentración en equivalentes trolox de los extractos de diclorometano activos por los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

COD UTP	NOMBRE DE LA PLANTA	EQUIVALENTES TROLOX	
		DPPH	ABTS
157	<i>Clusia multiflora</i>	27,58	439,25
159	<i>Tovomita guianensis</i>	46,55	285,77
175	<i>Piper crassinervium</i>	34,51	291,56
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	28,88	428,86
184	<i>Vismia laevis</i>	17,29	134,84
	Hidroquinona	54,31	901,91

Para los extractos de diclorometano al igual que con los extractos metanólicos, se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante significativamente mayores para el ensayo ABTS^{•+}, pero a diferencia de ellos no se encontró una buena correlación entre ambos ensayos (anexo 8), puesto que algunos extractos que presentaron buena actividad antioxidante en uno de los ensayos pero no se comportaron de la misma manera en el otro.

Para el ensayo DPPH[•] el rango de concentración en equivalentes trolox para dichos extractos varió desde 17,29 µg Trolox/g de extracto hasta 46.55 µg Trolox/g de extracto. Se puede observar que las especies más destacadas por sus concentraciones altas de equivalentes trolox fueron *Tovomita guianensis* (UTP 159) y *Piper crassinervium* (UTP 175) con valores de 46.55 y 34,51 µg de trolox/g de extracto, respectivamente.

Para el ensayo ABTS^{•+} el rango de concentración en equivalentes trolox para dichos extractos varió desde 134,84 µg trolox/g de extracto hasta 439,25 µg Trolox/g de extracto para el ensayo ABTS^{•+}. Las especies que presentaron las concentraciones más destacadas en equivalentes trolox al igual que para el ensayo DPPH[•] fueron *Clusia multiflora* (UTP 157) y *Chrysoclamys floribunda* (UTP 180) con valores de 439,25 y 428,86 µg de trolox/g de extracto, respectivamente.

Como se mencionó, se encontraron diferencias entre los dos ensayos de captura de radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) empleados y se dieron algunas razones que podrían explicar dichas diferencias. Además, es necesario mencionar como una posible explicación que aunque ambos ensayos miden la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para capturar el radical libre preformado, sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. El radical libre DPPH[•] es estable en su formación por fácil disolución en metanol. En contraste, el radical catión ABTS^{•+} se crea por reacción entre el ABTS con el oxidante, persulfato de potasio, lo cual lo hace menos estable y mas transitorio.

En términos de tiempo de corrida, los extractos reaccionan mas lentamente con el radical DPPH[•] necesitando 30 minutos para alcanzar su estado estacionario lo cual lo pone en ventaja con el radical catión ABTS^{•+}, el cual alcanza su estado estacionario muy rápidamente (Mathew et al., 2005); por tanto, la estequiometría de las reacciones y el mecanismo de reacción son muy distintos.

Otra diferencia importante entre ambos ensayos es que el ABTS^{•+} puede ser disuelto en un medio orgánico u acuoso y en ambos puede medirse su actividad antioxidante teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Wojdylo et al., 2007). Contrario a esto, el DPPH[•] solo puede medirse en un medio orgánico, lo cual es un limitante para la interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos evaluados (Surveswaran et al., 2007) y podría ser una razón para la diferencia presentada entre el potencial de captura.

Pérez-Jiménez et al., (2006) analizaron la influencia del solvente en la capacidad antioxidante; encontraron que en el ensayo ABTS^{•+}, los extractos en agua presentaron 40% mas actividad antioxidante que aquellos disueltos en metanol-agua (50:50 v/v); por el contrario, en el ensayo DPPH[•] se pudo observar claramente una disminución de la actividad ena los extractos acuosos.

6.3 Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de los fenoles totales presentes en los extractos de las plantas se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Magalhães et al., 2010), para aquellos extractos de plantas que presentaron un porcentaje de actividad antioxidante mayor al 25% en el ensayo de DPPH[•].

Se realizó la curva de calibración del ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0,9956 (figura 27); la cual permitió determinar el contenido de fenoles totales para los extractos de metanol y diclorometano.

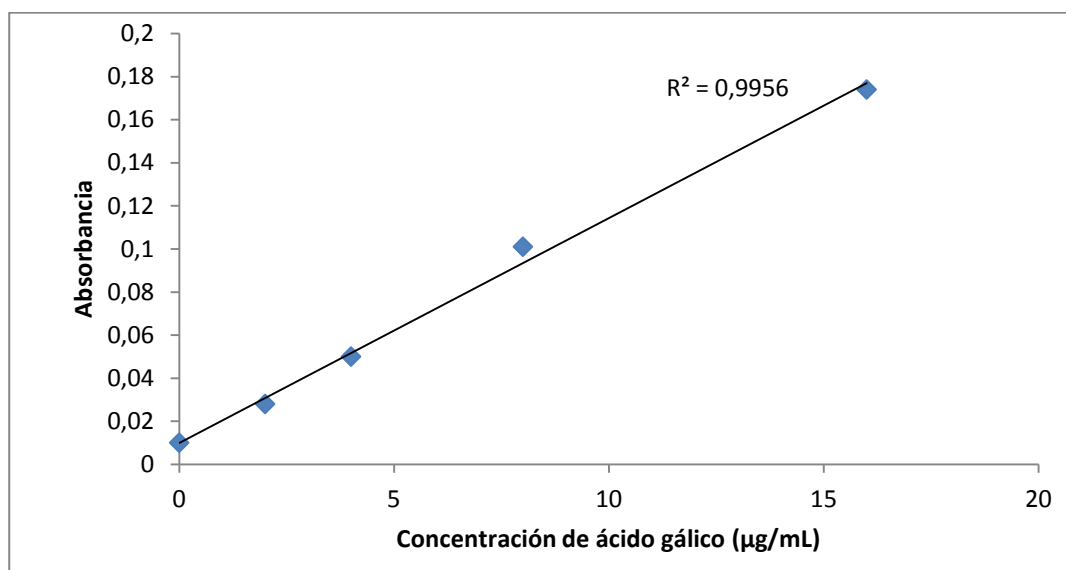


Figura 27. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles totales.

En la tabla 12 se presenta el contenido de fenoles totales (CFT) en equivalentes de ácido gálico (EAG) (μg de ácido gálico/mg de extracto) para los extractos de metanol.

Tabla 12. Contenido de fenoles totales (CFT) para los extractos de metanol activos.

UTP	Nombre de la planta	CFT (μg de ácido gálico/mg de extracto)
29	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	$4,95 \pm 0,07$
30	<i>Palicourea thyrsigloria DC.</i>	$6,39 \pm 0,20$
141	<i>Passiflora apoda</i>	$3,56 \pm 0,13$
157	<i>Clusia multiflora</i>	$9,47 \pm 0,34$
159	<i>Tovomita guianensis</i>	$6,88 \pm 0,06$
160	<i>Topobea cf discolor</i>	$9,18 \pm 0,21$
175	<i>Piper crassinervium</i>	$3,22 \pm 0,07$
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	$4,66 \pm 0,21$
182	<i>Passiflora danielli</i>	$3,99 \pm 0,20$
183	<i>Passiflora rubra</i>	$5,10 \pm 0,54$
184	<i>Vismia laevis</i>	$5,82 \pm 0,08$
199	<i>Solanum acerifolium</i>	$0,53 \pm 0,07$
200	<i>Mandevilla veraguensis</i>	$12,26 \pm 0,06$
201	<i>Blepharodon grandifolium</i>	$5,34 \pm 0,47$
202	<i>Alchornea grandis</i>	$10,24 \pm 0,20$

El contenido de fenoles totales para los extractos en metanol varía entre $0,53 \pm 0,07$ y $12,26 \pm 0,06$ μg de ácido gálico/g de extracto. Se puede observar que las especies que presentaron el mayor contenido de fenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG) fueron *Mandevilla veraguensis* (Apocynaceae) con $12,26 \pm 0,06$ μg de ácido gálico/g de extracto, *Alchornea grandis* (Euphorbiaceae) con $10,24 \pm 0,20$ μg de ácido gálico/g de extracto, *Clusia multiflora* (Clusiaceae) con $9,47 \pm 0,34$ μg de ácido gálico/g de extracto y *Topobea cf discolor* (Melastomataceae) con $9,18 \pm 0,21$ μg de ácido gálico/g de extracto (tabla 12); de los varios algunos ya se habían resaltado anteriormente por su alto porcentaje de actividad antioxidante.

Se halló una correlación significativa (mayor a 0.5) entre los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos tanto por el ensayo DPPH[•] como por el ensayo ABTS^{•+} con el contenido de fenoles totales de los extractos de metanol activos con valores de R^2 : 0,6807 (anexo 10) y R^2 : 0,6196 (anexo 11), respectivamente.

Muchos reportes han mostrado una cercana relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de las plantas. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron destacados, sin embargo, no se puede considerar que la actividad antioxidante se deba solo a la presencia de compuestos fenólicos, puesto que en su composición química pueden existen otros metabolitos secundarios que debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante (Amzad et al., 2011).

Lo anterior se hace evidente con los extractos metanolicos *Mandevilla veraguensis* (UTP 200) y *Clusia multiflora* (UTP 157), puesto que ambos mostraron porcentajes de actividad antioxidante significativamente menores con respecto a *Alchornea grandis* (UTP 202) o *Topobea cf discolor* (UTP 160) (figura 28), y a pesar de ello su contenido de fenoles fue relativamente mayor.

En otros trabajos se ha reportado un alto contenido de compuestos fenólicos en la familia Euphorbiaceae; por ejemplo en la especie *Alchornea Cordifolia* (Kouakou-Siransy et al., 2010) y las especies *Phyllanthus debilis* y *Phyllanthus maderaspatensis* (Kumaran et al., 2007). Además para la *Hypericum lidium* (Clusiaceae) (Şerbetçi et al., 2012) y *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) (Zakaria et al., 2011). Todos coinciden en una relación directa entre el potencial de captura de radicales de las especies reportadas con su alto contenido de fenoles.

En la tabla 13 se presenta el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico (EAG) (μg de ácido gálico/mg de extracto) para los extractos de diclorometano. Se observa que el contenido de fenoles totales para los extractos de diclorometano se encontró en un intervalo entre $0,72 \pm 0,18$ EAG y $1,46 \pm 0,55$ EAG.

Tabla 13. Contenido de fenoles totales para los extractos de diclorometano activos.

UTP	Nombre de la planta	CFT (μg de ácido gálico/mg de extracto)
157	<i>Clusia multiflora</i>	$0,72 \pm 0,18$
159	<i>Tovomita guianensis</i>	$1,11 \pm 0,35$
175	<i>Piper crassinervium</i>	$1,46 \pm 0,55$
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	$0,92 \pm 0,21$
184	<i>Vismia laevis</i>	$1,11 \pm 0,06$

En la figura 28 se relacionan el contenido de fenoles totales para los extractos de metanol y diclorometano activos. En este gráfico se puede observar claramente que los extractos de metanol presentaron un contenido de fenoles más alto que los extractos de diclorometano; aspecto que indica que los porcentajes de actividad antioxidante que se obtuvieron por medio de los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} para dichos extractos podría atribuirse a la presencia de otro tipo de metabolitos secundarios (Mosquera et al., 2009)

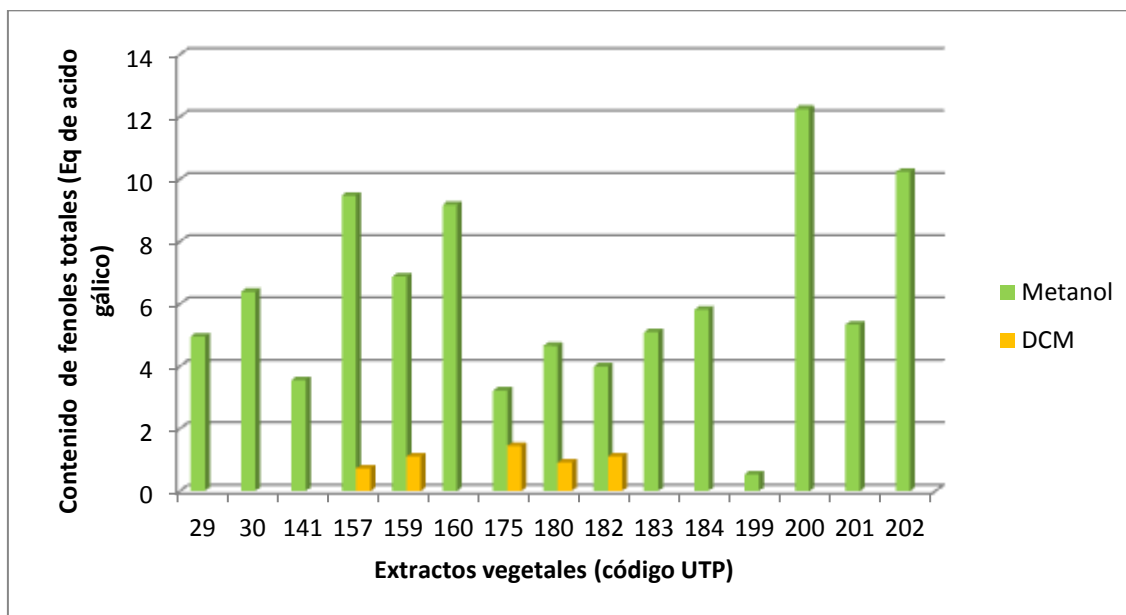


Figura 28. Contenido de fenoles totales para los extractos de Metanol y Diclorometano

Determinación del contenido de flavonoides totales

Se ha comprobado que los flavonoides presentan un rango amplio de acciones farmacológicas; tales como fuerte actividad antimicrobiana, antitrombótica, antimutagénica, anticancerígena y son los agentes antioxidantes predominantes entre los compuestos fenólicos (Hossain et al., 2011); por lo cual se decidió cuantificar el contenido de flavonoides totales en los extractos en estudio para, determinar si la actividad antioxidante estaba directamente relacionada con el contenido de estos metabolitos.

La determinación del contenido de flavonoides totales se realizó siguiendo el método de Kim et al., (2003); para aquellos extractos de las especies que presentaron un porcentaje de actividad antioxidante mayor al 25% por el ensayo DPPH[•]. Los resultados se expresaron en μg de Kaempferol/mg de extracto (equivalentes de kaempferol: EK).

En la figura 29 se muestra la curva de calibración de kaempferol obtenida, con un coeficiente de correlación de 0,9986 entre concentración de kaempferol y su respectiva absorbancia (anexo 12), por medio de la cual se determinó el contenido de flavonoides totales para los extractos de metanol y diclorometano.

Los flavonoides son los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en las plantas y se clasifican en diferentes tipos. Algunos patrones de sustitución en estos otorgan mayor capacidad antioxidante; por ejemplo, la sustitución del anillo "c" con un doble enlace C2-C3, un grupo ceto en la posición C4 y un grupo OH en la posición C3 (figura 9) provee a algunos flavonoides gran capacidad antioxidante la cual puede incrementar con sustitución polihidroxilada en el anillo B (Tsimogiannis et al., 2005).

Podría existir una correlación alta entre el porcentaje de actividad antioxidante obtenido por los diferentes ensayos (DPPH[•] y ABTS^{•+}) y el contenido de fenoles totales con su contenido de flavonoides totales (Surveswaran et al., 2007), teniendo en cuenta su gran aporte como antioxidante; sin embargo, no debe dejarse de lado el hecho de que la actividad antioxidante también está influenciada por otros metabolitos secundarios

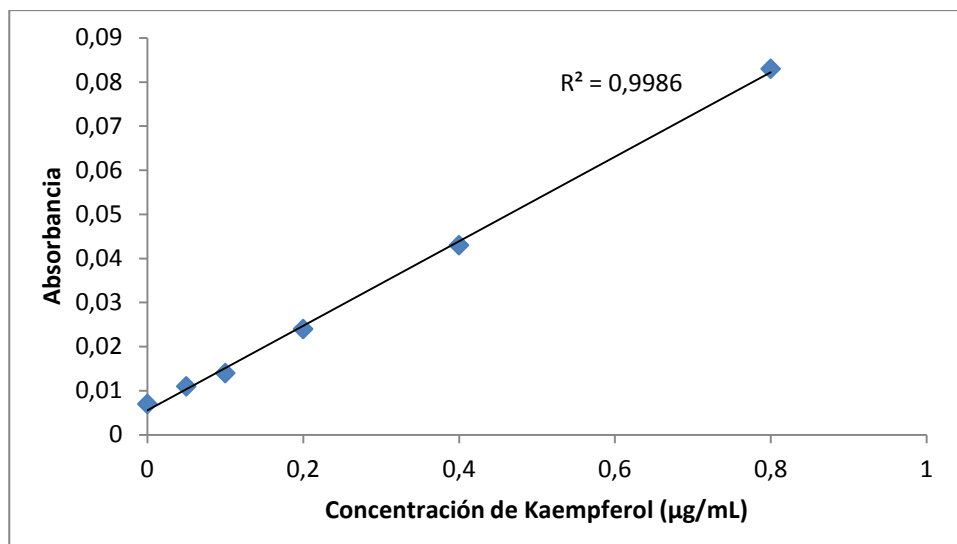


Figura 29. Curva de calibración del kaempferol.

En la tabla 14 se muestran el contenido de flavonoides totales en equivalentes de kaempferol para cada uno de los extractos de metanol.

Tabla 14. Contenido de flavonoides totales en equivalentes de kaempferol para los extractos de metanol activos.

UTP	Nombre de la planta	EK (μg de kaempferol/mg de extracto)
29	<i>Palicourea andaluciana Standl</i>	$0,28 \pm 0$
30	<i>Palicourea thyrsglora DC.</i>	$0,52 \pm 0,001$
141	<i>Passiflora apoda</i>	$0,37 \pm 0,004$
157	<i>Clusia multiflora</i>	$0,66 \pm 0,001$
159	<i>Tovomita guianensis</i>	$0,29 \pm 0,001$
160	<i>Topobea cf discolor</i>	$0,31 \pm 0,001$
175	<i>Piper crassinervium</i>	$0,16 \pm 0,001$
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	$0,66 \pm 0$
182	<i>Passiflora danielli</i>	$0,12 \pm 0,002$
183	<i>Passiflora rubra</i>	$0,18 \pm 0,002$
184	<i>Vismia laevis</i>	$0,41 \pm 0,003$
199	<i>Solanum acerifolium</i>	$0,13 \pm 0,001$
200	<i>Mandevilla veraguensis</i>	$0,50 \pm 0,003$
201	<i>Blepharodon grandifolium</i>	$0,31 \pm 0,004$
202	<i>Alchornea grandis</i>	$0,44 \pm 0,003$

El contenido de flavonoides totales para los extractos de metanol se encontró entre $0,12 \pm 0,002$ y $0,66 \pm 0,001$ μg de Kaempferol/g de extracto. Los extractos que poseen el mayor contenido de flavonoides totales son *Clusia multiflora* (UTP 157), *Chrysoclamys floribunda* (UTP 180) ambos con $0,66$ μg de Kaempferol/mg de extracto; *Palicourea thyrsigloria* DC. (UTP 30) con $0,52 \pm 0,001$ μg de Kaempferol/mg de extracto y *Mandevilla veraguensis* (UTP 200) con $0,50 \pm 0,003$ μg de Kaempferol/g de extracto.

Los extractos de *Topobea cf discolor* (UTP 160) y *Alchornea Grandis* (UTP 202) que ya habían sido mencionados previamente por sus altos porcentajes de actividad antioxidante con valores de 40,80% y 39,27% respectivamente, obtenidos mediante el ensayo DPPH[•] y de los cuales se esperaba un contenido de flavonoides muy alto, se obtuvieron valores de $0,31 \pm 0,001$ y $0,44 \pm 0,003$ μg de Kaempferol/mg de extracto, respectivamente; lo cual indica que su actividad antioxidante depende moderadamente de su contenido de flavonoides y que posiblemente otro tipo de metabolitos secundarios pueden influir en su capacidad para capturar radicales libres.

De acuerdo con lo anterior, muchos trabajos han reportado una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de flavonoides. Alvarez-Suarez et al., (2010) reportó un $R^2: 0.83$ entre ABTS^{•+} y su contenido de flavonoides; Chaieb et al., (2011) reportó un $R^2: 0.807$ entre DPPH[•] y su contenido de flavonoides. En este trabajo no se consiguió una relación proporcional entre los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} y su contenido de flavonoides totales con índices de correlación de $R^2: 0,015$ y $R^2: 0,031$, valores realmente bajos que podrían estar asociados con otros constituyentes pro-oxidantes o a la presencia de metales en los extractos, puesto que los flavonoides tienen alta tendencia a quelar metales, lo cual podría interferir con su cuantificación (Zhang et al., 2010).

Por otro lado, los coeficientes de correlación entre el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales aunque para los extractos de metanol no fue muy alto ($R^2: 0,3108$) (ver anexo 13), por lo cual se puede

inferir que sin descartar la presencia de flavonoides su capacidad de captura puede depender de otros compuestos fenólicos y no fenólicos.

Lo anterior concuerda con Lizcano et al., (2010), quienes reportaron una baja correlación entre el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides, indicando que los extractos pueden contener tanto compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, taninos, ácidos fenólicos) como compuestos no fenólicos (carotenoides, alcaloides) que pueden influir en el potencial antioxidante de los mismos.

Otra razón para la baja correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de flavonoides es el grado de protonación o desprotonación de los grupos hidroxilos, el cual puede tener influencia sobre el comportamiento químico de los compuestos antioxidantes y determinar que aumente o disminuya su capacidad para capturar electrones (Tyraknowska et al., 1999), por lo cual los flavonoides presentes en los extractos de metanol activos evaluados podrían presentar un mayor grado de desprotonación y causar un aumento en su actividad antioxidante.

Por el contrario, para los extractos de diclorometano se halló una correlación entre el contenido de fenoles y flavonoides mucho más significativa (R^2 : 0,608) indicando que los flavonoides presentes en dicho extracto influyen de manera más marcada en su capacidad antioxidante, que otro tipo de compuestos como saponinas, triterpenos, esteroides los cuales también contribuyen con su actividad antioxidante (ver anexo 14).

En la tabla 15 se muestran el contenido de flavonoides totales en equivalentes de kaempferol para cada uno de los extractos de diclorometano.

El contenido de flavonoides totales para los extractos de diclorometano fue notablemente muy bajo, los valores oscilan desde $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}$ de Kaempferol/mg de extracto para los extractos de *Clusia multiflora* y *Tovomita guianensis* hasta $0,18 \pm 0,01 \mu\text{g}$ de Kaempferol/mg de extracto correspondiente a *Piper crassinervium*. Si bien el extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (UTP 159) mostró un porcentaje de actividad antioxidante muy destacado cuando se evaluó por el ensayo DPPH $^{\bullet}$ a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$ relacionándolo con su contenido de flavonoides; se puede inferir que

esta actividad no depende exclusivamente de su contenido de flavonoides, aunque se evidencie la presencia de ellos en una proporción muy baja.

Tabla 15. Contenido de flavonoides totales en equivalentes de kaempferol para los extractos de diclorometano activos.

UTP	Nombre de la planta	EK(μ g de kaempferol/mg de extracto)
157	<i>Clusia multiflora</i>	0,05 \pm 0,01
159	<i>Tovomita guianensis</i>	0,05 \pm 0
175	<i>Piper crassinervium</i>	0,18 \pm 0,01
180	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	0,03 \pm 0,03
184	<i>Vismia laevis</i>	0,13 \pm 0,01

Para el extracto de diclorometano *Piper crassinervium* (UTP 175) se reportó un contenido de flavonoides totales de 0,18 \pm 0,01 μ g de Kaempferol/mg de extracto, valor que podría considerarse bueno si se compara con los extractos de diclorometano evaluados, pero que se encuentra entre los valores más bajos comparado con los resultados obtenidos para los extractos metanólicos. Esto podría confirmar, como se había mencionado anteriormente, que los extractos de diclorometano por lo general poseen otro tipo de compuestos y en cantidades más bajas se encuentran este tipo de flavonoides.

En la figura 30 se co-relacionan el contenido total de flavonoides para los extractos de metanol y diclorometano activos; se puede observar claramente que los extractos de metanol tienen un contenido de flavonoides más alto que los extractos de diclorometano, hecho que indica que los porcentajes de actividad antioxidante que se obtuvieron por medio de los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} para dichos extractos podría deberse a la presencia de otro tipo de metabolitos secundarios.

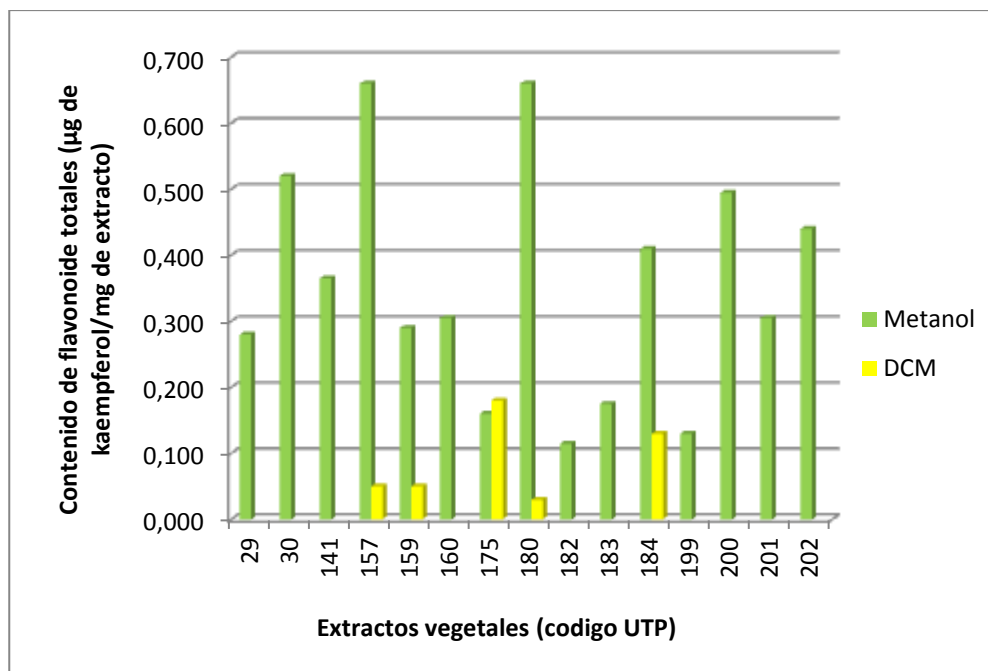


Figura 30. Contenido total de flavonoides para los extractos de MeOH y DCM

Comparando el contenido de fenoles totales (figura 28) y el contenido de flavonoides totales (figura 30) se observa que en ambos casos los extractos de metanol presentaron mayor contenido de los metabolitos cuantificados que los extractos de diclorometano. Como se había mencionado previamente, por lo general los extractos de diclorometano contienen en su gran mayoría otro tipo de metabolitos como sapogeninas, triterpenos, esteroides, a los cuales se les puede atribuir dicha capacidad antioxidante (Mosquera et al., 2009).

6.4 Caracterización de flavonoides por HPLC-DAD y espectroscopia de UV-Visible

6.4.1 Perfil cromatográfico de flavonoides de los extractos crudos en estudio.

La espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) que está basada en la radiación UV-Vis, causa en una molécula la promoción de electrones de su estado basal a un estado de energía excitado (Naseem et al., 2010). El espectro de absorción UV-Vis de los constituyentes de las plantas pueden ser medidos en soluciones

contra una referencia y/o un solvente blanco; la absorbancia es medida a longitudes de onda entre 190 y 800 nm (Samprieto et al., 2009).

Una evaluación exacta de la absorción UV-Vis de los polifenoles es de gran importancia para (i) predecir el espectro óptico de nuevos compuestos, (ii) entender la modulación del color en flores y frutas, (iii) estimar la capacidad de los compuestos para actuar como filtros UV y (iv) comprender la capacidad de los compuestos de transformarse químicamente por inducción de luz UV (Anouar et al., 2012).

Por medio del tamizaje de la actividad antioxidante realizado a través del ensayo DPPH[·] se encontró que quince extractos de metanol y cinco extractos de diclorometano poseían un porcentaje de actividad antioxidante mayor al 25% (extractos activos).

De las familias de plantas evaluadas solo la familia Clusiaceae se mostró activa de ambos extractos (metanol y diclorometano) con las especies *Clusia multiflora* (UTP 157) y *Tovomita guianensis* (UTP 159). Por tal razón, se escogieron dichos extractos para el análisis por HPLC, teniendo en cuenta que ambos pertenecían a la misma familia y podrían encontrarse patrones similares de flavonoides; además, pretendiendo de esta manera obtener un protocolo de separación más uniforme. El extracto de metanol *Topobea cf discolor* (UTP 160) perteneciente a la familia *Melastomataceae* también se sometió a análisis por HPLC, puesto que su porcentaje de actividad antioxidante sobresalió entre los extractos metanólicos.

Después de realizar varias pruebas se siguieron diferentes protocolos para los extractos de metanol (UTP 157, 159 y 160) y otro para los extractos de diclorometano (UTP 157, 159) puesto que no se lograba una buena separación utilizando un mismo gradiente para ambos tipos de extractos; por consiguiente, se variaron las proporciones, el flujo y el tiempo de corrida como se mencionó previamente en la metodología.

Los patrones de flavonoides que se muestran en la figura 31 ácido gálico (ácido fenólico), hesperidina (Flavononona), 7-hidroxicumarina, naringenina (flavononona), kaempferol (flavonol), apigenina (flavona) se evaluaron por separado y en una mezcla equimolar de todos ellos, con cada uno de los sistemas de corrida ensayados. Tomando como base el tiempo de retención de

los patrones y de cada uno de los extractos y comparándolos entre sí, se evidenció la presencia de dichos compuestos en los extractos. Por otro lado, sus espectros UV se tomaron como base para encontrar núcleos de flavonoides similares dentro de los extractos.

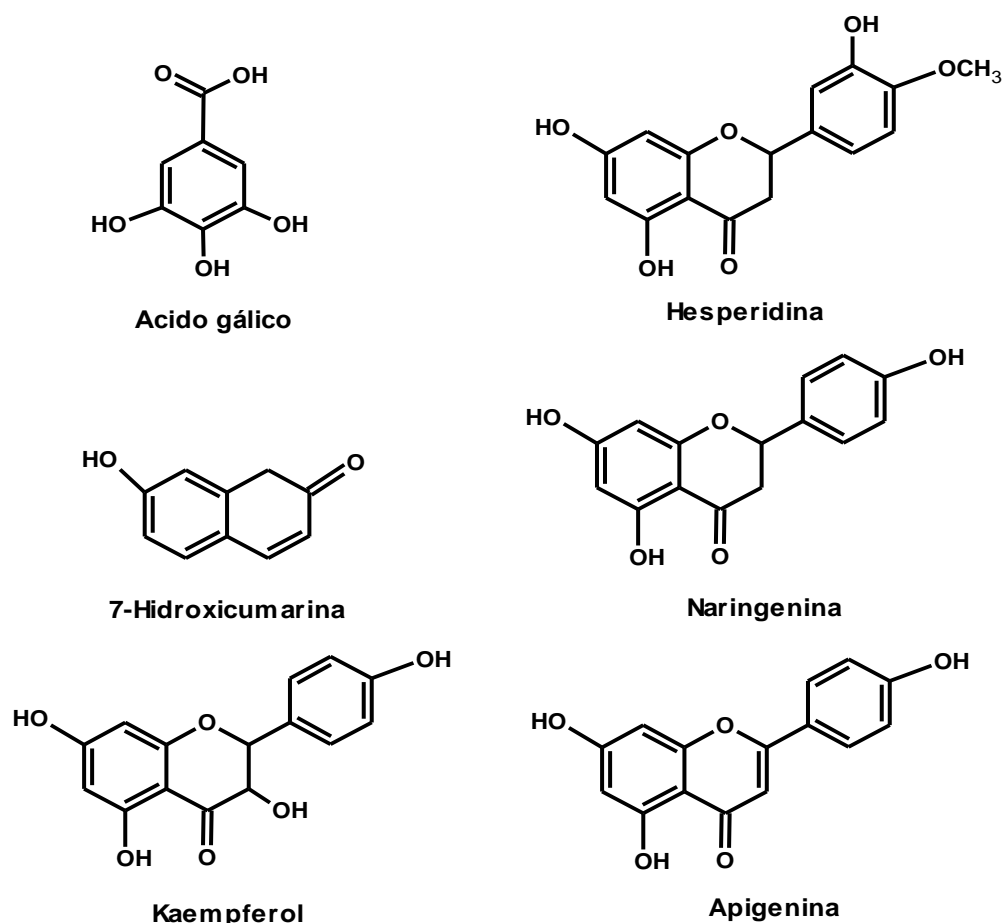


Figura 31. Patrones de flavonoides utilizados como referencias

HPLC es la técnica más popular para separación de los constituyentes de las plantas, entre ellos, los flavonoides, donde se deben optimizar ciertas condiciones (fase estacionaria, eluente y gradiente). De esta manera, las flavonas eluyen con tiempos de retención menores que los flavonoles a causa del grupo OH (ver figura 11). A su vez las flavononas y flavonoles eluyen con menores tiempos de retención que sus correspondientes flavonas y flavonoles respectivamente, debido al efecto de insaturación en la posición 2 y 3 (ver figura 11) (Andersen et al., 2006). Actualmente para un perfil cromatográfico

de flavonoides se utiliza un detector de arreglo de diodos (DAD), el cual permite escanear espectros de UV-Vis por medio de estos caracterizar los flavonoides (Andersen et al., 2006).

Samprieto et al., (2009) clasificaron las diferentes clases de flavonoides con diversos rangos de longitudes de onda de los espectros UV para cada tipo (tabla 2). Se hace necesario especificar que las longitudes de onda que se presentan en dicha tabla son aproximadas, puesto que los espectros UV puede presentar movientos batocrómicos e hipsocrómicos dependiendo del grado de sustitución o glicosidación de los flavonoides presentes en la muestra, adicionando a lo anterior que las muestras que se analizaron fueron extractos crudos.

En la tabla 16, se presenta información detallada de los estándares analizados por cada uno de los sistemas utilizados (ver metodología numeral 5.6.2); tiempos de retención, longitudes de onda a las cuales aparecen la banda I y la banda II en los espectros UV y el tipo de flavonoide. Los espectros UV de cada uno de los estándares se encuentran en el anexo 15.

Tabla 16. Señales de los estándares de flavonoides obtenidos por HPLC con el sistema de elución 1.

Nombre	T _R	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de compuesto
Acido gálico	6,637	230	272	Ácido fenólico
7-hidroxycoumarina	16,904	240	291 336	Hidroxycoumarina
Hesperidina	18,346	238	285 ~h328	Flavonona
Naringenina	25,161	234	289	Flavonona
kaempferol	25,265	247	351	Flavonol
Apigenina	25,478	253	292 345	Flavona

Condiciones cromatográficas:

Gradiente de elución A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% de B, 2-6 min 73% de B, 6-10 min 48% B, 10-20 min 48% B, 20-22 min 40% B, 22-24 min 20% B, 24-32 min 10% B y 32-35 min 100% A. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 35 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

Entre los estándares se usaron diferentes clases de flavonoides: ácido fenólico, coumarina, flavononas, flavonoles y flavonas; los cuales permitieron identificar el comportamiento de los diferentes núcleos y su efecto en el espectro; facilitando la caracterización de los flavonoides presentes en los diferentes extractos.

En la figura 32 se muestra el perfil cromatográfico por HPLC del extracto de metanol de *Clusia multiflora* (UTP 157) con un porcentaje de actividad antioxidante de 28,96% a través del ensayo DPPH[•], a las longitudes de onda de 280, 330 y 350 nm (figura 32 A, B y C, respectivamente. A una longitud de onda de 280 nm se pueden observar 12 picos, donde solo ocho de ellos se clasificaron como flavonoides, considerando las características de su espectro UV.

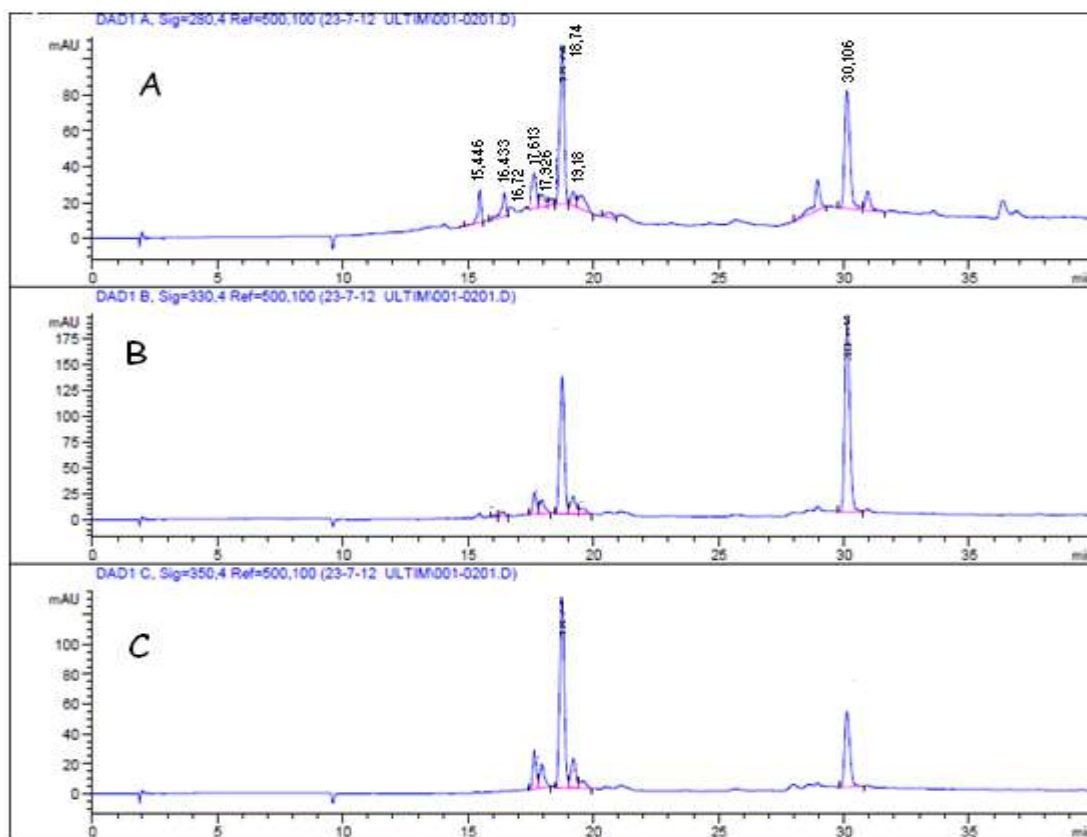


Figura 32. Perfil cromatográfico del extracto de metanol de *Clusia multiflora* (UTP 157) a longitud de onda de 280, 330 y 350 nm. Sistema de elución gradiente 0-100% B (solvente A metanol, solvente B ácido fórmico al 1%).

En la tabla 17, se presentan los tiempos de retención de cada pico, las longitudes de onda a las cuales aparecen la banda I y la banda II en el espectro UV y el tipo de flavonoide que se atribuye a dichas longitudes de onda.

Tabla 17. Señales obtenidas a través del perfil cromatográfico del extracto metanólico de *Clusia Multiflora* (UTP 157) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV

t_R (min)	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
15,446	229	274	Flavononol o flavonona
16,433	~h214	296	Isoflavona
	228		
16,72	229	276	Isoflavona
17,613	228	350	Flavona o flavonol
	~h 279		
17,926	223	348	Flavona o flavonol
	~h 253		
	~h 267		
18,74	229	337	Flavonol
	268		
19,18	257	355	Flavona o flavonol
30,106	220	325	Flavonol
	~h 240		
	~h 251		

Condiciones cromatográficas:

Gradiente de elución A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% de B, 2-6 min 73% de B, 6-10 min 48% B, 10-20 min 48% B, 20-22 min 30% B, 22-24 min 30% B, 24-32 min 20% B y 32-40 min 0% A. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 40 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

Con base a la tabla 17, se puede observar que los primeros tres picos poseen tiempos de retención muy cercanos entre sí, pero no se clasificaron dentro del mismo tipo de flavonoide. De acuerdo con Samprieto et al., (2009) y Andersen et al., 2006, los flavononoles y las flavonononas presentan su pico máximo de absorción entre 270-295 (banda I) (hecho que se confirma al observar el espectro UV del estándar que se usó, anexo 15); mientras que las isoflavonas muestran un máximo de absorción entre los 240-270 (banda II). Observando el

espectro UV y sus respectivos tiempos de retención (t_R) de 16,433 y 16,720 minutos, se pudo determinar que el pico máximo de absorción se encuentra a 228 y 229 nm, respectivamente, valores menores al rango mencionado anteriormente, lo cual indica que puede tratarse de una isoflavona con el anillo A sustituido (que se pueden encontrar metoxilado o glicosidado) especialmente la posición C5 (figura 33) lo cual genera un desplazamiento hipsocrómico de la banda II de 7-17 nm aproximadamente (Samprieto et al., 2009).

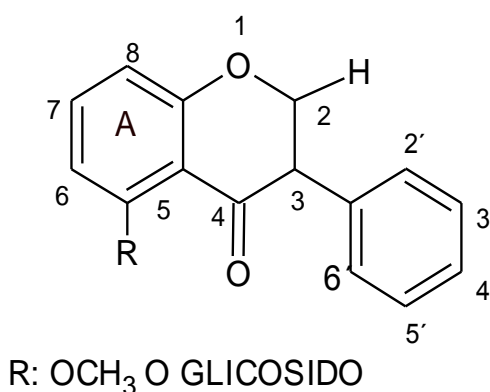


Figura 33. Isoflavona metoxilada o glicosidada en la posición C₅.

Para los otros tiempos de retención siguiendo las características de su espectro UV se clasificaron como flavonas o flavonoles. Para este tipo de compuestos la banda I puede encontrarse entre los 320-370 nm y la banda II entre 240 y 290 nm. Se puede observar que para el t_R : 17,613, t_R : 17,926 y t_R : 18,740 la banda II se encuentra a menor longitud de onda del rango citado previamente en la literatura, lo cual puede deberse a la cantidad de grupos hidroxilos metilados o glicosidados presentes en la estructura, causando desplazamientos hipsocrómicos en esta banda (Samprieto et al., 2009).

Los tiempos de retención t_R : 18,740 y t_R : 30,106 se clasificaron como flavonoles comparando su espectro con el espectro del kaempferol, corrido como estándar (anexo 15). Se puede observar que la banda I de estos dos picos se encuentra a menor longitud de onda que el resto de los picos que se clasificaron en este grupo; lo que podría atribuirse a que las flavonas tienen mayor conjugación debido al grupo ceto presente en su estructura y podrían desplazarse a mayores longitudes de onda; por otro lado, podría ser una

flavona con los grupos hidroxilos de las posiciones 3,5,4' metoxilados o glicosidados, lo cual origina un desplazamiento hipsocrómico en la banda I.

En la figura 34, se muestra el espectro que corresponde a un tiempo de retención de 18,740 minutos, el cual se clasificó dentro del grupo de flavonas y flavonoles. Se puede observar la banda I de mayor intensidad a 337nm y la banda ii con dos picos a 229 y 268 nm, longitudes de onda características de este tipo de flavonoides (Samprieto et al., 2009). Los otros espectros UV correspondientes a los tiempos de retención restantes se pueden observar en el anexo 16.

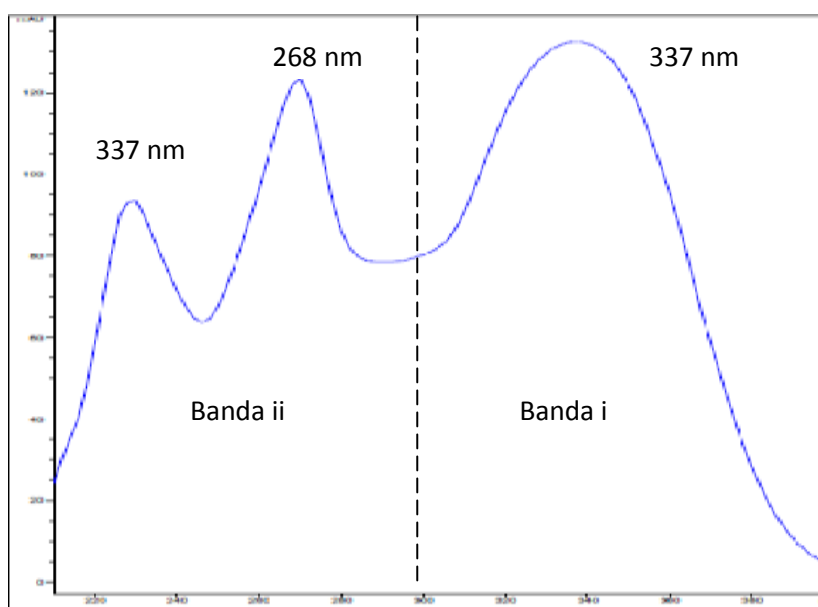


Figura 34. Espectro UV correspondiente al t_R : 18.740 min del extracto de metanol de *Clusia multiflora* (UTP 157) a una longitud de onda de 280 nm.

Los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos de diclorometano de *Clusia multiflora* (UTP 157), de metanol y diclorometano de *Tovomita guianensis* (UTP 159) y el de metanol de *Topobea cf discolor* (UTP 160), se presentan en los anexos 17, 19, 21 y 23 respectivamente.

En el perfil cromatográfico del extracto de diclorometano de *Clusia multiflora* (UTP 157) (Anexo 17 A) se pueden observar 7 picos a una longitud de onda de 280 nm, de los cuales seis se clasificaron como flavonoides de acuerdo con las características de sus espectros UV, los cuales se presentan en el anexo 18.

En la tabla 18 se relacionan los tiempos de retención de cada pico del extracto de diclorometano de *Clusia multiflora* (UTP 157) con las longitudes de onda que presenta cada espectro UV (bandas I y II) y el tipo de flavonoide que se le atribuye de acuerdo con sus características. Este extracto presentó un porcentaje de actividad antioxidante de 34,19% evaluado por el ensayo DPPH'.

Tabla 18. Señales obtenidas mediante el perfil cromatográfico del extracto de diclorometano de *Clusia multiflora* (UTP 157) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV

Tr	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
15,001	238	~h264	Flavononol o Flavonona
		294	
15,561	279	320	Cumarina
16,675	240	325	Flavonol
	280		
17,995	235	292	Flavanona o flavononol
	~h249		
18,935	273	335	Flavona o flavonol

Condiciones cromatográficas:

Gradientes en proporciones del solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% B, 2-6 min 50% B, 6-10 min 20% B, 10-12 min 10% B 12-20 min 10% B, 22-25 min 0% B, 25-30 min 0% A El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 30 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

Los t_R : 15,001 y t_R : 17,995 se clasificaron como flavononoles y flavononas, teniendo en cuenta que para ambos el pico máximo de absorción se encuentra a los 290 nm aproximadamente, pero sus patrones de sustitución pueden ser diferentes, puesto que el primero presentó un hombro en la banda I a 264 nm lo cual indica sustituciones en el anillo B; por el contrario, el segundo presentó un hombro en la banda I a 249 nm, lo cual sugiere sustituciones en el anillo A.

El tiempo de retención t_R : 15,561 se clasificó como una cumarina puesto que dicho pico presenta valores muy cercanos a los mencionados por Samprieto et al., (2009), característicos para las cumarinas, a 274 y 311 nm. Teniendo en cuenta que pueden haber desplazamientos batocrómico, si la banda que se encuentra a menor longitud de onda (Banda II) presenta sustituciones en la

posiciones C5, C7 y C8, o si la banda que se encuentra a mayor longitud de onda (Banda I) podría haber presencia de un grupo hidroxilo en su estructura.

Los picos correspondientes a los tiempos de retención restantes se clasificaron como flavonas o flavonoles puesto que estos se encuentran en el rango especificado previamente (tabla 2) para este tipo de flavonoides.

De acuerdo con el perfil cromatográfico realizado y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los extractos metanólico y de diclorometano, se puede considerar que *Clusia multiflora* (UTP 157) podría incluir en su composición química flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, isoflavonas y cumarinas. En la literatura se ha hallado que la familia Clusiaceae además de ser fuente de flavonoides también se caracteriza por tener otros metabolitos secundarios como xantonas, triterpenoides, ácidos orgánicos y benzofenonas preniladas (Cuesta-Rubio et al., 2005); de los cuales las xantonas se han caracterizado por ser fuertes captadoras de radicales libres (Franklin et al., 2009) y podrían otorgar a la especie gran potencial como antioxidante.

En otros trabajos Bagget et al., (2005), demostraron la presencia de benzofenonas en la especie *Clusia multiflora* a las cuales le atribuyen cierto tipo de actividades biológicas, entre las cuales se encuentra actividad antioxidante y lograron aislar seis (6) de estos compuestos, Clusiacromona C, Clusiacitran A, Clusiacitran B, Clusiaciclol a, Clusiaciclol B, Nemorosomal.

En el perfil cromatográfico del extracto de metanol de *Tovomita Guianensis* (UTP 159) (anexo 19) se observaron 7 picos a una longitud de onda de 280 nm, de los cuales seis se clasificaron como flavonoides de acuerdo con las características de su espectro UV.

En la tabla 19 se resumen los tiempos de retención para los picos más sobresalientes del extracto metanoólico de *Tovomita guianensis* (UTP 159), las longitudes de onda que presentan la bandas I y II del espectro UV y el tipo de flavonoide que se atribuye de acuerdo con sus características. Este extracto presentó un porcentaje de actividad antioxidante de 31,18% evaluado por el ensayo DPPH[•].

De acuerdo con el espectro UV de cada señal obtenido mediante el perfil cromatográfico (ver anexo 20), todos se clasificaron como flavonas y/o flavonoles. En la tabla 19 se puede notar que las longitudes de onda de la banda II para los diferentes tiempos de retención son muy cercanas, por lo cual podría esperarse que su núcleo fuese muy similar con variaciones pequeñas en sus patrones de sustitución, lo cual, podría explicar las diferencias en la banda I (ver tabla 2). Según Samprieto et al., (2009), si se incrementa la oxidación del anillo A, como consecuencia, se origina un desplazamiento batocrómico de la banda II, así mismo si se incrementa o la glicosidación se produce un desplazamiento hipsocrómico y no presenta mayores efectos en la banda I; este planteamiento podría justificar el comportamiento de los espectros UV de este extracto.

Tabla 19. Señales obtenidas mediante el perfil cromatográfico para el extracto de metanol *Tovomita guianensis* (UTP 159) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV

Tr	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
15,009	229	350	Flavona
	~h 260		
	~h269		
15,262	230	~h295 348	Flavona
	~h257		
	~h268		
15,642	~h 232	347	Flavona
	~h 259		
	~h 270		
15,969	229	336	Flavonol
	270		
16,682	~h246	338	Flavonol
	270		
17,622	232	335	Flavonol
	~h 268		

Condiciones cromatográficas:

Gradiente de elución A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% de B, 2-6 min 73% de B, 6-10 min 48% B, 10-20 min 48% B, 20-22 min 30% B, 22-24 min 30% B, 24-32 min 20% B y 32-40 min 0% A. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 40 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

Por otro lado, en el respectivo perfil cromatográfico del extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (UTP 159) (anexo 21) se pueden observar 11 picos a una longitud de onda de 280 nm, de los cuales seis se clasificaron como flavonoides de acuerdo con las características de su espectro UV.

En la tabla 20 se resumen los tiempos de retención para el extracto *Tovomita guianensis* (UTP 159) de diclorometano con las longitudes de onda correspondientes a cada espectro UV (bandas I y II) y el tipo de flavonoide que se le atribuye de acuerdo con dichas características. Este extracto presentó un porcentaje de actividad antioxidante 54,19% evaluado por el ensayo DPPH[•].

Tabla 20. Señales obtenidas mediante el perfil cromatográfico para el extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (UTP 159) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV

Tr	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
16,524	225	274	Isoflavona
17,53	279	341	Flavona o flavonol
18,824	238	~h322 372	Isoflavona
	~h260		
	~h282		
19,39	291	344	Flavona o flavonol
19,697	218	290	Flavona o flavonol
	234	327	
20,357	225	278	Isoflavona
22,924	280	345	Flavona o flavonol

Condiciones cromatográficas:

Gradiente de elución A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 80% de B, 2-6 min 60% de B, 6-16 min 20% B, 16-40 min 10% B, 40-55 min 50% B. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 35 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

En este extracto, se encontraron 2 tipos de flavonoides después de realizar su perfil cromatográfico, 3 señales se identificaron como isoflavonas teniendo en cuenta que presentaron su máximo de absorción a longitudes de entre 225-240 nm; a pesar de que la literatura cita un rango entre 240-270 nm; es muy probable que algunas de ellas presenten sustituciones en el anillo A diferentes a grupos OH que las desplazan entre 7-17 nm hipsocromicamente. Los espectros UV de estos picos pueden analizarse en el anexo 22.

Para el t_R : 19,697, a pesar de que se clasificó como flavona o flavonol es posible que pueda estar el núcleo flavonólico sobreponiéndose con otro diferente en el mismo pico. Al observar el espectro UV (figura 35) se puede observar 4 bandas de gran intensidad que podrían también representar patrones de sustitución correspondientes a la estructura de la flavona o el flavonol.

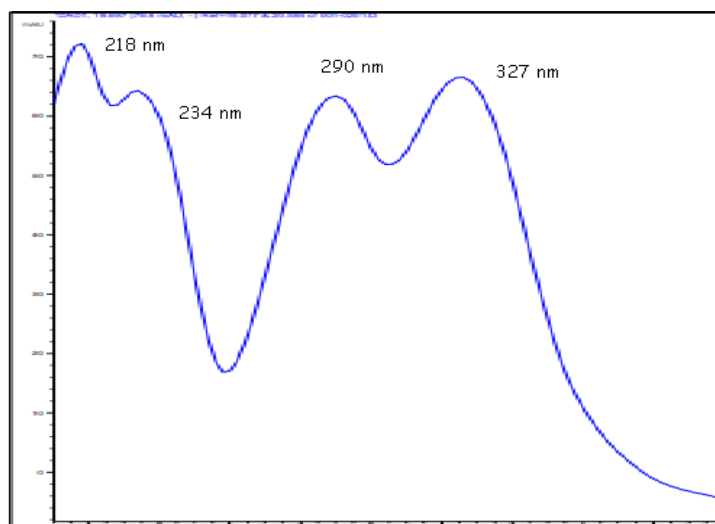


Figura 35. Espectro UV correspondiente al t_R : 19.697 min del extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (UTP 159) a una longitud de onda de 280 nm.

Según el perfil cromatográfico realizado para los extractos de metanol y diclorometano de la especie *Tovomita guianensis* (UTP 159), se encontró que ésta en su composición fitoquímica presenta flavonoides como flavonas, flavonoles e isoflavonas. Como se había mencionado la familia Clusiaceae a la cual pertenece esta especie es fuente de gran variedad de metabolitos secundarios, Cuesta-Rubio et al., (2005) demostraron la presencia de benzofenonas preniladas en las especies *T. krukovii*, *T. mangle* y *T. brevistaminea* del género *Tovomita*, por lo cual se podría inferir la presencia de dicho compuesto en la especie *Tovomita guianensis*

En la tabla 21 se relacionan los tiempos de retención de cada pico del cromatograma del extracto *Topobea cf Discolor* (UTP 160) en metanol (anexo 23), con las longitudes de onda que tipifican cada espectro UV (bandas I y II) y el tipo de flavonoide que se le atribuyó de acuerdo a dichas características. Este extracto, mostró un porcentaje de actividad antioxidante de 45,83% evaluado por el ensayo DPPH \cdot . En el respectivo cromatograma se pueden

observar diez picos a una longitud de onda de 280 nm, de los cuales seis se clasificaron como flavonoides de acuerdo con las características de su espectro UV.

Tabla 21. Señales obtenidas mediante el perfil cromatográfico para el extracto de metanol de *Topobea cf Discolor* (UTP 160) y las longitudes de onda para sus respectivos espectros UV

Tr	Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
9,134	228	272	Flavonol o flavonona
14,454	230	273	Flavonol o flavonona
15,82	~h 231	342	Flavona
	251		
	262		
16,46	231	347	Flavona
	265		
16,754	234	335	Flavonol
	273		
17,674	233	334	Flavonol
	273		

Condiciones cromatofigráficas:

Gradiente de elución A (metanol) y el solvente B (ácido fórmico al 1%): 0-2 min 100% de B, 2-6 min 73% de B, 6-10 min 48% B, 10-20 min 48% B, 20-22 min 30% B, 22-24 min 30% B, 24-32 min 20% B y 32-40 min 0% A. El tiempo total de corrida y post-corrida fueron 40 min y 5 min respectivamente, la temperatura de la columna fue 30°C.

El perfil cromatográfico de flavonoides para el extracto *Topobea cf Discolor*, se logró clasificar en dos tipos de flavonoides por medio de los espectros UV, flavonoles o flavononas y flavonas y flavonoles. Como ya se había mencionado es muy probable que las flavonas o flavonoles se encuentren sustituidas en el anillo A, razón por la cual sufre desplazamientos a menores longitudes de onda en la banda I. Para las flavononas y flavonoles se tomaron como base los espectros UV de los estándares de flavononas, flavonas y flavonoles para clasificar y buscar similitudes con sus respectivos núcleos. Los espectros UV correspondientes a los diferentes tiempos de retención observados en el cromatograma se presentan en el anexo 24.

7. CONCLUSIONES

- Se encontraron en total 15 extractos de metanol y 5 extractos de diclorometano activos, evaluados por el ensayo DPPH[•] y por el ensayo ABTS^{•+}. La actividad antioxidante obtenida por el ensayo ABTS^{•+} fue significativamente mayor a la obtenida por el ensayo DPPH[•]; sin embargo, se encontró una buena correlación entre ambos. Los extractos de metanol de *Topobea cf discolor* y de diclorometano de *Clusia multiflora* presentaron los porcentajes más altos de actividad antioxidante con valores de 45,83% (49,78 µg de trolox/ g de extracto) y 42,80% (46,85 µg de trolox/ g de extracto) respectivamente.
- Las familias Euphorbiaceae y Melastomataceae presentaron los resultados más destacados con respecto a la actividad antioxidante de los extractos en metanol, lo cual está relacionado directamente con su contenido de fenoles. Es necesario resaltar que ambos extractos (MeOH y DCM) de familia Clusiaceae mostrarán buena actividad antioxidante.
- Por medio de los espectros UV de los extractos de las plantas *Topobea cf discolor*, *Clusia Multiflora* y *tovomita guianensis* se encontró que estas en general poseen en su composición fitoquímica, flavonas, flavonoles, flavononas, flavononoles y cumarinas.
- Se evidenció que la flora evaluada, procedente del Parque Regional Ucumari y la Reserva Natural Bremen-La popa, constituye una fuente promisorio de metabolitos secundarios, tales como flavonoides, fenoles, esteroides, saponinas y alcaloides.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar la separación y caracterización de los compuestos activos del extracto de la planta *Topobea cf discolor*, basados su alta capacidad antioxidante obtenida mediante los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} y su contenido fenólico.
- Estudiar otras formas de determinación de la capacidad antioxidante para analizar más a fondo el comportamiento de las plantas estudiadas por los diferentes métodos.
- Continuar con el análisis fitoquímico detallado y antioxidante de especies de la flora regional, puesto que la presencia de diferentes metabolitos en su composición química las hace fuentes promisorias en la búsqueda de biomoléculas con actividades biológicas.

9. BIBLIOGRAFIA

Abdulmanea K., Prokudina E., Lanková P., Vaníčková L., Koblavská R., Zelený V., Lapčík O. (2012). Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. *Biochemical Systematics and Ecology*; 45: 237-243.

Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21: 143-152.

Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani El., Astolfi P., Bompadre St., Battino M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*; 48: 2490-2499.

Amzad M., Dawood M. (2011). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*

Andersen Q.M., Markhan K.R. (2006). Flavonoids-chemistry, biochemistry and applications. Taylor and Francis Group, Boca raton.

Anouar E.H., Gierschner J., Duroux J-L., Trouillas P. (2012). UV-Visible spectra of natural polyphenols: A time depend density functional theory study. *Food Chemistry*; 131: 79-89.

Arnér Elias S.J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 495-526.

Arts M., Haenen G., Voss H-P., Bast A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*; 42: 45-49.

Assad S.F., Singh S., Ahmad A., Khan N., Hadi S.Y. (2001). Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chemic-Biological Interactions*; 37: 59-74.

Augustus G.D.P.S., Seiler G.J. (2011). Phytochemicals of selected plant species of the Apocynaceae and Asclepidaceae from Webstern, Talm Nadu, India. *Biomass an Bioenergy*; 35: 3012-3017.

Ayyad N., Basaif S.A., Al-Saggaf T., Alarif M. (2012). Vincamine and 14-*epi*-vincamine indole alkaloids from *Ambelania occidentalis*. *Journal of Saudi Chemical Society*; 16: 419-422.

Bagget S., Mazzola E., Kennelly C. (2005). The benzophenones: Isolation, structural elucidation and biological activities. *Studies in Natural Products Chemistry*; 32: 721-771.

Babbar N, Oberoi H.S., Uppal D.S., Patil R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*; Vol 44: 391-396.

Basma A., Zakaria Z., Yoga L., Sasdharan S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screeing of the methanol extracts of *Euphorbia Hirtal*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 4:386-390.

Bhattacharjee R., Parames C., (2007). Protein isolated from herb, *Phyllantus níurí* L. (Euphorbiaceae), plys hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidants properties. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 817-826.

Bentiger N., Brismark K., Dallner G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*; 7:541-550.

Beserra M., Machado P., Campos A., Do Prado G., Carvalho C., Arraes G., Gomes T. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*; 44: 2155-2159.

Brand-Williams B., Berset W., (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH'free radical method. *LWT - Food Science and Technology*; 30: 609-615.

Brawek B., Löffler M., Wagner K., Huppertz H-J., Weyerbrock A., Jackisch R., Feuerstein T.J. (2010). Reactive oxygen species (ROS) in the human neocortex: Role of aging and cognition. *Brain Research Bulletin*. 81: 484-490.

Buitrago D.C., Mosquera O.M., Niño J., Correa Y.M. (2005). Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia Et Technica*; 27: 231 - 234.

Cardoso C.L., Silva H.S., Castro-Gamboa Ian., Bolzani V.S. (2005). New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*; 16: 1353-1359.

Carocho M., Ferreira I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*; 51: 15-25.

Carneiro P., Duarte M., Videira A. (2012). Disruption of alternative NAD(P)H dehydrogenases leads to decreased mitochondrial ROS in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*; 52: 402-409.

Carreño N., Vargas A., Bernal A., Restrepo S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *phytophthora altenaria* y *Ralstonia* en Colombia, una revisión. *Agronomía colombiana*; 25: 320-329.

Çelik S.E., Özyürek M., Güçlü K., Apak R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*; 8: 1300-1309.

Cemeli E., Baumgartner A., Anderson D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*; 681: 51-67.

Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V., (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*; 91: 107-110.

Chaieb N., González J.L., López-Mesas M., Bouslama M., Valiente M., (2011). Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia *Food Research International*; 44: Pages 970-977.

Chen Z., Bertini R., Frolidi G. (2013). EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH[•] assay using several statistical programs. *Food Chemistry*; 138: 414-420.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H., Kim S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*; 163: 1161-1168.

Cimanga R.K., Mulyeni P.N.K., Kambu O.K., Tona G.L., Apers S., Totté J., Rieters L., Vlietinck A.J. (2010). The spasmolytic activity of extracts and some isolated compound from the leaves of *Morinda morindades* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae). *Journal of ethnopharmacology*; 127: 215-220.

Crozier A., Jensen E., Lean M., McDonald M. (1997). Quantitative analyses of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*; 761: 315-321.

Cuesta-Rubio O., Piccinelli A., Ratrelli L. (2005). Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives. *Studies in Natural Products Chemistry*; 23: 671-720.

Cutler R., (1984). Urate and Ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species.

Davis C., Anderson W., (2010). A complete generic phylogeny of *Malpichiaceae* data and morphology. *American journal of botany*; 97: 2031-2048.

Deginani N.B (1999). *Passifloraceae*, flora del valle de Verma. Herbario de ciencias naturales, Universidad Nacional de Salta; 6: 2.

Deng J., Cheng W., Yang G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*; 125: 1430-1435.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*; 97: 654-660.

Doria E., Buonocore D., Focarelli A., Marzatico F. (2012). Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2012: 13 pages

Dorman H.J.D, Hiltunen R. (2004). Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis L.*) extract and subfractions. *Food chemistry*; 88:193-199.

Evergetis E., Michaelakis A., Haroutounian S.A. (2013) Exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes. *Industrial Crops and Products*; 41: 365-370.

Franklin G., Conceição L., Kombrink E., Dias A. (2009). Xantona biosynthesis in *Hypericum perforatum* cell provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry*; 70: 60-68.

Floegel A., Kim D-O., Chung S-J., Koo S.I., Chun O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*; 24: 1043-1048.

Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O. (2011). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*; 1822: 1363-1373.

Gil del Valle L. (2011). Oxidative stress in aging: theoretico outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine and aging pathology*; 1: 1-7.

Gonzales J., Morales F. (2009). Flora digital de la selva, Organización para estudios tropicales.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 572-584.

Hidalgo M., Sanchez-Moreno C., Pascual-Teresa S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*; 121: 691-696

Hossain M.A, Shah M.D., Gnanaraj C., Iqbal M. (2011). In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 4: 717-721.

Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 1841-1856.

Jaitak V., Sharma K., Kalia K., Kumar N., Singh H.P., Kaul V.K., Singh B. (2010). Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis*; 23: 142-147.

Joselin J., Brintha T.S., Rayam A., Leeva S. (2012). Screening of select ornamental flowers of the family Apocynaceae for phytochemical constituents. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*; 2: s260-s264.

Joshi S., Verma A., Mathela C. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*; 48: 37-40

Kang G.D., Yunk C.K., Lee H.S. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvents extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*; 87: 231-236.

Katalinic v., Modun D., Music I., Boban M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; 140: 47-52.

Kim B.Y., Lee K.S., Choo Y.M., Kim I., Je Y.H., Woo S.D., Lee S.M., Park H.C., Sohn H.D., Jin B.R. (2008). Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 150: 161-169.

Kouakou-Siransy G., Sahpaz S., Irié-Nguessan G., Datte Y.J., Kablan J., Gressier B., Bailleul F. (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Food Chemistry*; 118:430-435.

Kumarappan C.T., Thialagam E., Mandal S. (2012). Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi Journal of Biological Sciences*; 19: 349-355.

Kumaron A., Karunakuran J. (2007). Invitro antioxidant activities of methanol extracts of five *phyllanthus* species from India. *Food science and technology*; 40: 344-352.

León de Fernandez O.S. (2004). Estrés oxidativo teoría. EN: Rosas A.R (ed). *Nuevas fuentes de antioxidantes naturales*. CYTEC. Caracas.

Lizcano L.J., Bakkali F., Ruiz-Larrea M., Ruiz-Sanz J.I. (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*; 119: 1566-1570

Li Z-y., Yang Y., Ming M., Liu B. (2011). Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 414: 5-8.

MacKenzie E.L., Ray P.D., Tsuji Y. (2008). Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 44: 1762-1771.

Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*; 83: 441-447.

Marnett L.J., (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*; 424 : 83-95.

Martinez M., Jimenez J., Cruz R., Juarez E., García R., Cervantes A., Mejia R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en Mexico. *Anales del instituto de biología universidad Nacional Autónoma de Mexico. Serie botánica*; 73: 155-281.

Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. (2007) Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*; 101:465-470.

Maškovi Z., Manojlovi N.T., Mandić Anamarija., Mišan A.Č., Milovanović I., Marija M., Radojković., Cvijović M.S., Solujić S.R. (2012). Phytochemical screening and biological activity of extracts of plant species *Halacsya sendtneri* (Boiss.) Dörf. *Hem. Ind*; vol 66: 43-51.

Matilla P., Astal J., Kumpdanen J. (2000). Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48: 5834-5841.

Mendoza H. (2006). *Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Mimeraceae de Colombia*. Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt; Universidad del Cauca.

Merken M., Beecher R. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of agricultural and food chemistry*; 48: 577-599.

Migliore L., Coppedè F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 674:73-84.

Mishra P., Samanta L. (2012). Oxidative Stress and Heart Failure in Altered Thyroid States. *The Scientific World Journal*; 2012: 17 paginas.

Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for stimating antioxidant activity. *Journal of science and technology*; 26: 211-219.

Morales F. (2006). Estudios en las *Apocynaceaes* neotropicales xxviii: La familia *Apocynaceae* del Salvador, Centroamerica. *Darwaniana*; 44: 453-489.

Mosquera O, Correa Y, Buitrago D, Niño J. (2007) Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 102: 631-634.

Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A. (2008). Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutrition Research*; 28: 583-589.

Murillo J. (2004). Las *Euphorbiaceaes* de Colombia-Biota colombiana, Instituto de investigación de recursos bilógicos Alexander Von Humboldt; 5: 183-199.

Nardi J.M., Dal B., Monache F.D., Pizzolatti M.G., Ribeiro-Vale R.M. (2006). Anticonceptive effect of *Croton Cetidifolius Bail* (Euphorbiaceae). *Journal of ethnopharmacology*; 107: 73-78.

Naseem B., Shah S.W.H., Hasan A., Shah S.S. (2010). Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media: A UV-Visible spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular spectroscopy*; 75: 1341-1346.

Niño J, Mosquera O, Echeverry L. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica*; 41: 232-236

Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*; 130: 1036-1043.

Osadebe P., Okoye F., Uzor P., Nnamani N., Adiele I. (2012). Phytochemical analysis hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchorne Cordifolia* methanol leaf extract on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 5:289-293

Osman A.M., Wong K.K.Y., Fernyhough A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 346: 321-329.

Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. (2009). Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*; 46: 1109-1118.

Pastore A., Federecci G., Bertini E., Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*; 333: 19-39.

Pepe H., Serda S., Revan S., Aekr P., Kutoglu F. (2009). Comparison of oxidative stress and antioxidant capacity before and after running exercises in both sexes. *Gender Medicine*; 6: 587-595.

Pérez-Jimenez., Saura-Calixto F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*; 39: 791-800.

Podsedek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*; 40: 1-11.

Ramírez, R., Echeverri, F., (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. *Scientia et Technica*; 1: 41-43.

Ramos A., Vizoso A., Piloto J., García A., Rodriguez C.A., Rivero R. (2003). Screening and antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*; 87: 241-246.

Raskyn I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Llic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*; 20:12.

Re R., Pellegrini Ni., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*; 26: 1231-1237.

Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*; 582: 1783-1787.

Samprieto D.A., Catalan C., valtuone M. (2009). Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. *Science publishers*.

Sarikurkcu C., Arisoy K., Tepe B., Cakir A., Abali G., Mete E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitexagnuscastus* L. fruits from Turkey. Food and Chemical Toxicology 47: 2479-2483.

Sayyah M., Hadidi N., Kamalinejad M. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. Journal of Ethnopharmacology; 92: 325-329.

Şerbetçi T., Özsoy N., Can A., Kültür S., Can Başer K.H. (2012). Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of *Hypericum lydium* Boiss. Industrial Crops and Products 36: 599-606

Siddhuraju P., Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. Food Chemistry; 101: 10-19.

Singleton V.L., Orthofer R.O., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol; 299: 152-178.

Siransy G.K., Sahpaz S., Irié-Nguessan G., Datte Y.J., Kablan J., Gressier B., Bailleul F. (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. Food Chemistry; 118: 430-435.

Spácil Z., Novóková L., Solich P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. Talanta; 76:189-199.

Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C. (2004). Free radical Scavenging behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH' System. Journal of agricultural and food chemistry; 52: 912-915.

Surveswaran S., Cai Y-Z., Corke H, Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry; 102: 938-953.

Tapia A., Rodriguez J., Theoduloz C., Lopez S., Feresin G.E., Schmeda-Hirschmann G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *baccharis grisebachii*. Journal of Ethno-pharmacology; 95: 155-161.

Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elmat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*; 104: 1372-1378.

Tepe B., Daerera D., Tepe A-S., Polissiou M, Sokmen A. (2007). Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. *Food Chemistry*; 103:358-1364

Trabelsi N., Oueslati S., Falleh H., Waffo- Tégou P., Papastamoulis Y., Mérillon J-M., Abdelly C., Ksouri R. (2012). Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*; 135: 1419-1424.

Tsimogiannis D.I., Oreopoulou V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A Kinetic approach for the 3', 4' - hydroxy substituted members. *Innovative food science and emerging technologies*; 7: 140-146

Tyrakowska B., Soffers A., Szymusiak H., Boeren S., Boersma M.G., Lemańska K., Vervoort J., Rietjens I. (1999). TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free Radical Biology and Medicine*; 27:1427-1436.

Webster R.D. (1999). Voltammetric studies on the α -tocopherol anion and α -tocopheroxyl (Vitamin E) radical in acetonitrile. *Electrochemistry Communications*; 1: 581-584.

Weyemi U., Dupuy C. (2012). The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*; 7: 77-81.

Wojdylo A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*; 105: 940-949.

Wootton-Beard P.C., Moran A., Ryan L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*; 44: 217-224.

Xu C., Zhang Y., Cao L., Lu J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*; 119: 1557-1565

Zhang J., Yue L., Hayaf K., Xia S., Zhang X., Ding B., Tony J., Chen Z. (2010). Purification of flavonoids from *Ginkgo biloba* extract by zinc complexation method and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*; 71: 273-278

Zhu K-X., Lian C-X., Guo X-N., Peng W., Zhou H-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* 126: 122-126.

Zuleta A., Esteve M., Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*; 114: 310-316

ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de actividad antioxidante promedio de los extractos de metanol evaluados, obtenidos mediante el ensayo DPPH*

UTP	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS*
	ensayo 1	ensayo 2		
28	22,52	21,00	21,76	1,07
29	26,40	29,55	27,98	2,23
30	24,81	25,91	25,36	0,78
141	26,80	29,55	28,18	1,94
151	7,00	8,18	7,59	0,83
152	19,00	21,36	20,18	1,67
153	23,60	25,00	24,30	0,99
154	16,95	15,33	16,14	1,15
157	28,00	29,91	28,96	1,35
159	32,92	29,44	31,18	2,46
160	46,43	46,73	46,58	0,21
165	21,23	20,23	20,73	0,71
168	11,31	12,75	12,03	1,02
171	14,40	16,37	15,39	1,39
172	23,85	20,83	22,34	2,14
173	22,35	19,46	20,91	2,04
174	15,69	14,62	15,16	0,76
175	26,82	28,87	27,85	1,45
180	28,39	27,57	27,98	0,58
182	28,40	29,91	29,16	1,07
183	28,40	29,35	28,88	0,67
184	31,18	29,88	30,53	0,92
185	7,94	6,97	7,46	0,69
194	18,99	16,96	17,98	1,44
196	22,35	20,24	21,30	1,49
197	13,97	16,67	15,32	1,91
199	27,17	28,87	28,02	1,20
200	25,14	26,31	25,73	0,83
201	29,52	30,37	29,95	0,60
202	38,54	40,00	39,27	1,03

*DS: Desviación estandar

Anexo 2. Porcentajes de actividad antioxidante promedio de los extractos de diclorometano evaluados, obtenidos mediante el ensayo DPPH*

UTP	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS*
	ensayo 1	ensayo 2		
28	15,49	17,52	16,51	1,44
29	2,94	1,58	2,26	0,96
30	12,28	14,23	13,26	1,38
141	23,68	24,09	23,89	0,29
151	3,29	3,07	3,18	0,16
153	13,62	11,68	12,65	1,37
154	21,86	19,00	20,43	2,02
157	35,53	32,85	34,19	1,90
159	55,83	54,10	54,97	1,22
160	12,52	13,13	12,83	0,43
165	17,69	20,36	19,03	1,89
168	12,98	14,02	13,50	0,74
171	15,12	15,54	15,33	0,30
172	13,89	14,02	13,96	0,09
173	12,98	15,38	14,18	1,70
174	11,16	12,29	11,73	0,80
175	32,34	32,57	32,46	0,16
180	28,36	26,84	27,60	1,07
184	25,44	24,82	25,13	0,44
185	11,70	14,64	13,17	2,08
194	22,60	23,73	23,17	0,80
196	18,90	15,67	17,29	2,28
197	11,16	10,16	10,66	0,71
199	12,68	16,60	14,64	2,77
200	19,36	21,71	20,54	1,66
201	1,92	5,26	3,59	2,36
202	21,18	24,15	22,67	2,10

*DS: Desviación estandar

Anexo 3. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH[•] para los extractos de metanol activos, evaluados a diferentes concentraciones.

a. UTP 29

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,38	4,06	3,22	1,19
50 ppm	11,9	12,18	12,04	0,20
100 ppm	11,26	13,33	12,30	1,46
250 ppm	21,83	21,16	21,50	0,47
500 ppm	23,86	26,62	25,24	1,95

b. UTP 30

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,6	3,6	3,60	0,00
50 ppm	11,85	11,71	11,78	0,10
100 ppm	17,52	18,02	17,77	0,35
250 ppm	21,64	24,77	23,21	2,21
500 ppm	25,25	25,23	25,24	0,01

a. UTP 141

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	5,07	3,59	4,33	1,05
50 ppm	13,85	14,87	14,36	0,72
100 ppm	18,46	21,02	19,74	1,81
250 ppm	24,1	25,13	24,62	0,73
500 ppm	25,12	28,21	26,67	2,18

d. UTP 157

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	8,6	7,47	8,04	0,80
50 ppm	15,42	15,73	15,58	0,22
100 ppm	20,56	18,18	19,37	1,68
250 ppm	23,12	21,96	22,54	0,82
500 ppm	26,88	27,1	26,99	0,16

c. UTP 159

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	6,94	4,9	5,92	1,44
50 ppm	17,59	16,08	16,84	1,07
100 ppm	20,83	20,27	20,55	0,40
250 ppm	22,22	22,72	22,47	0,35
500 ppm	24,07	29,52	26,80	3,85

f. UTP 160

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	6,72	4,76	5,74	1,39
50 ppm	21,56	20,77	21,17	0,56
100 ppm	35,82	35,93	35,88	0,08
250 ppm	38,65	40,96	39,81	1,63
500 ppm	46,21	45,45	45,83	0,54

e. UTP 175

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,22	3,28	2,25	1,46
50 ppm	5,55	4,49	5,02	0,75
100 ppm	11,02	9,38	10,20	1,16
250 ppm	18,36	17,84	18,10	0,37
500 ppm	22,45	23	22,73	0,39

h. UTP 180

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	7,85	5,61	6,73	1,58
50 ppm	9,12	7,27	8,20	1,31
100 ppm	14,13	13,63	13,88	0,35
250 ppm	13,33	13,64	13,49	0,22
500 ppm	22,78	19,3	21,04	2,46

i. UTP 182

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,24	1,58	1,41	0,24
50 ppm	3,73	3,16	3,45	0,40
100 ppm	7,05	7,91	7,48	0,61
250 ppm	14,94	12,34	13,64	1,84
500 ppm	21,58	24,05	22,82	1,75

j. UTP 183

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,65	1,94	2,30	0,50
50 ppm	13,22	12,14	12,68	0,76
100 ppm	19,05	18,45	18,75	0,42
250 ppm	23,8	22,33	23,07	1,04
500 ppm	26,45	24,27	25,36	1,54

k. UTP 184

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	4,32	3,25	3,79	0,76
50 ppm	15,68	16,47	16,08	0,56
100 ppm	22,7	22,74	22,72	0,03
250 ppm	25,94	28,51	27,23	1,82
500 ppm	28,11	29,24	28,68	0,80

l. UTP 199

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,9	2,1	2,00	0,14
50 ppm	5,04	5,63	5,34	0,42
100 ppm	11,43	10,92	11,18	0,36
250 ppm	16,66	17,64	17,15	0,69
500 ppm	20	19,32	19,66	0,48

m. UTP 200

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	8,96	7,35	8,16	1,14
50 ppm	16,52	18,61	17,57	1,48
100 ppm	21,84	23,31	22,58	1,04
250 ppm	29,41	29	29,21	0,29
500 ppm	29,41	29,87	29,64	0,33

n. UTP 201

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,78	2,63	3,21	0,81
50 ppm	5,46	4,28	4,87	0,83
100 ppm	10,5	10,2	10,35	0,21
250 ppm	16,81	13,82	15,32	2,11
500 ppm	22,27	19,08	20,68	2,26

o. UTP 202

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	10,97	14,77	12,87	2,69
50 ppm	32,06	34,02	33,04	1,39
100 ppm	33,33	36,76	35,05	2,43
250 ppm	38,49	38,83	38,66	0,24
500 ppm	40,37	40,54	40,46	0,12

Anexo 4. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH[•] para los extractos de diclorometano activos, evaluados a diferentes concentraciones.

a. UTP 157

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,73	1,58	1,66	0,11
50 ppm	9,47	9,57	9,52	0,07
100 ppm	21,05	19,14	20,10	1,35
250 ppm	22,1	23,35	22,73	0,88
500 ppm	26,34	23,68	25,01	1,88

b. UTP 159

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,07	3,32	3,20	0,18
50 ppm	19,3	17,67	18,49	1,15
100 ppm	27,19	27,62	27,41	0,30
250 ppm	38,59	35,35	36,97	2,29
500 ppm	42,51	43,09	42,80	0,41

b. UTP 175

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	4,6	1,11	2,86	2,47
50 ppm	11,71	7,46	9,59	3,01
100 ppm	16,31	16,04	16,18	0,19
250 ppm	24,68	25,51	25,10	0,59
500 ppm	28,87	34,15	31,51	3,73

d. UTP 180

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,52	2,89	2,71	0,26
50 ppm	13,55	12,72	13,14	0,59
100 ppm	18,81	19,65	19,23	0,59
250 ppm	23,83	23,53	23,68	0,21
500 ppm	24,3	28,15	26,23	2,72

e. UTP 184

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,52	2,89	2,71	0,26
50 ppm	13,55	12,72	13,14	0,59
100 ppm	18,81	19,65	19,23	0,59
250 ppm	23,83	23,53	23,68	0,21
500 ppm	24,3	28,15	26,23	2,72

Anexo 5. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+} para los extractos de metanol activos, evaluados a diferentes concentraciones.

a. UTP 29

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,9	2,52	2,71	0,27
50 ppm	4,08	5,21	4,65	0,80
100 ppm	9,54	7,06	8,30	1,75
250 ppm	13,97	12,41	13,19	1,10
500 ppm	25,89	21,68	23,79	2,98

b. UTP 30

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,66	1	0,83	0,24
50 ppm	2,15	3,31	2,73	0,82
100 ppm	5,28	5,28	5,28	0,00
250 ppm	10,89	12,23	11,56	0,95
500 ppm	17,16	15,86	16,51	0,92

c. UTP 141

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,98	2,1	1,54	0,79
50 ppm	3,58	4,53	4,06	0,67
100 ppm	6,68	7,12	6,90	0,31
250 ppm	12,87	12,45	12,66	0,30
500 ppm	23,13	23,62	23,38	0,35

d. UTP 157

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,49	0,51	0,50	0,01
50 ppm	4,11	4,79	4,45	0,48
100 ppm	8,39	9,76	9,08	0,97
250 ppm	20,19	20,89	20,54	0,49
500 ppm	38,42	36,99	37,71	1,01

d. UTP 159

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,47	1,72	2,10	0,53
50 ppm	9,45	7,06	8,26	1,69
100 ppm	10,26	8,26	9,26	1,41
250 ppm	20,98	18,76	19,87	1,57
500 ppm	33,06	30,8	31,93	1,60

f. UTP 160

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,34	1,31	1,83	0,73
50 ppm	10,05	12,03	11,04	1,40
100 ppm	23,44	24,39	23,92	0,67
250 ppm	48,52	48,78	48,65	0,18
500 ppm	92,29	93,11	92,70	0,58

f. UTP 175

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,46	0,17	0,32	0,21
50 ppm	1,48	2,25	1,87	0,54
100 ppm	4,27	5,55	4,91	0,91
250 ppm	8,37	9,19	8,78	0,58
500 ppm	21,7	23,78	22,74	1,47

h. UTP 180

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,41	1,99	1,70	0,41
50 ppm	6,7	8,97	7,84	1,61
100 ppm	10,76	10,8	10,78	0,03
250 ppm	20,11	22,75	21,43	1,87
500 ppm	34,39	37,04	35,72	1,87

g. UTP 182

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,39	1,76	1,58	0,26
50 ppm	2,66	2,99	2,83	0,23
100 ppm	5,15	5,2	5,18	0,04
250 ppm	11,13	11,07	11,10	0,04
500 ppm	18,6	19,58	19,09	0,69

j. UTP 183

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,5	0,74	1,12	0,54
50 ppm	4,49	4,77	4,63	0,20
100 ppm	6,98	4,56	5,77	1,71
250 ppm	9,8	7,6	8,70	1,56
500 ppm	18,11	17,9	18,01	0,15

h. UTP 184

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,31	1,63	1,47	0,23
50 ppm	3,6	3,42	3,51	0,13
100 ppm	7,38	8,14	7,76	0,54
250 ppm	17,7	18,72	18,21	0,72
500 ppm	32,45	31,27	31,86	0,83

i. UTP 199

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,86	0,5	0,68	0,25
50 ppm	3,85	3,95	3,90	0,07
100 ppm	4,49	5,29	4,89	0,57
250 ppm	8,73	6,68	7,71	1,45
500 ppm	22,24	21,46	21,85	0,55

i. UTP 200

EXTRACTO 200 MeOH	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,17	0,16	0,17	0,01
50 ppm	3,72	4,03	3,88	0,22
100 ppm	5,07	5,32	5,20	0,18
250 ppm	18,75	19,67	19,21	0,65
500 ppm	37,18	36,77	36,98	0,29

I. UTP 201

EXTRACTO 201 MeOH	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,84	1	0,92	0,11
50 ppm	8,56	6,37	7,47	1,55
100 ppm	12,58	12,47	12,53	0,08
250 ppm	25,5	23,5	24,50	1,41
500 ppm	37,42	38,89	38,16	1,04

a. UTP 202

EXTRACTO 202 MeOH	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,25	2,01	2,63	0,88
50 ppm	12,37	12,73	12,55	0,25
100 ppm	21,96	24,59	23,28	1,86
250 ppm	37,04	38,18	37,61	0,81
500 ppm	93,77	93,81	93,79	0,03

Anexo 6. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+} para los extractos de diclorometano activos, evaluados a diferentes concentraciones.

a. UTP 157

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	2,1	2,12	2,11	0,01
50 ppm	3,6	4,79	4,20	0,84
100 ppm	19,44	18,8	19,12	0,45
250 ppm	36,6	30,25	33,43	4,49
500 ppm	50,26	46,15	48,21	2,91

b. UTP 159 DCM

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,54	4,36	3,95	0,58
50 ppm	6,89	5,01	5,95	1,33
100 ppm	5,84	8,56	7,20	1,92
250 ppm	19,18	17,77	18,48	1,00
500 ppm	32,3	31,02	31,66	0,91

d. UTP 175

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	1,84	0,97	1,41	0,62
50 ppm	3,17	3,49	3,33	0,23
100 ppm	8,51	7,29	7,90	0,86
250 ppm	16,8	17,34	17,07	0,38
500 ppm	32,65	31,92	32,29	0,52

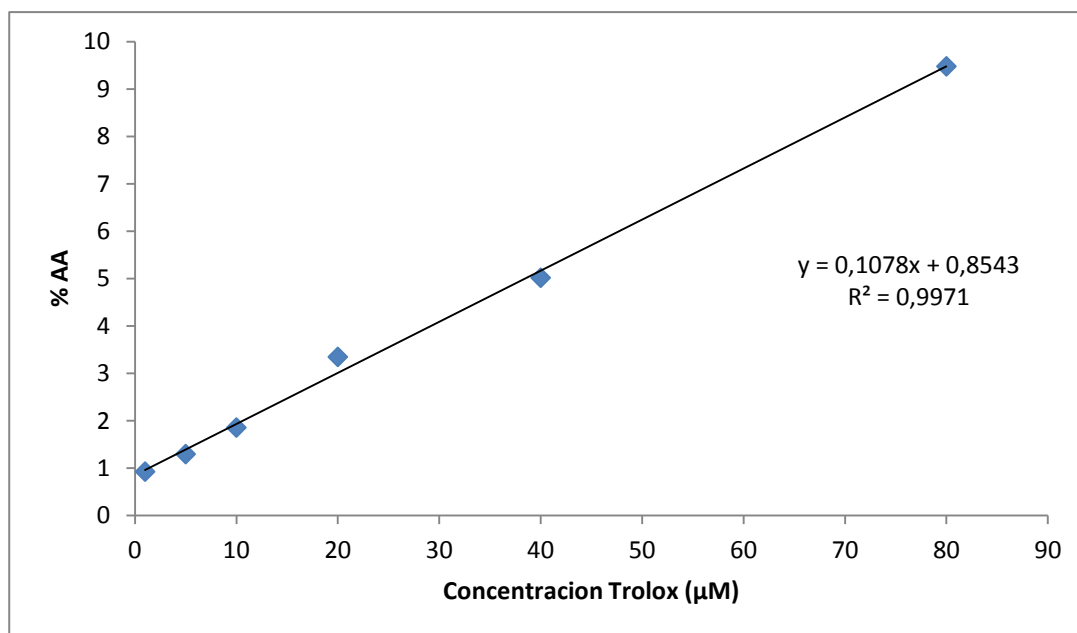
e. UTP 180

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	0,51	0,9	0,71	0,28
50 ppm	4,28	5,05	4,67	0,54
100 ppm	9,68	14,59	12,14	3,47
250 ppm	23,09	24,86	23,98	1,25
500 ppm	48,23	45,94	47,09	1,62

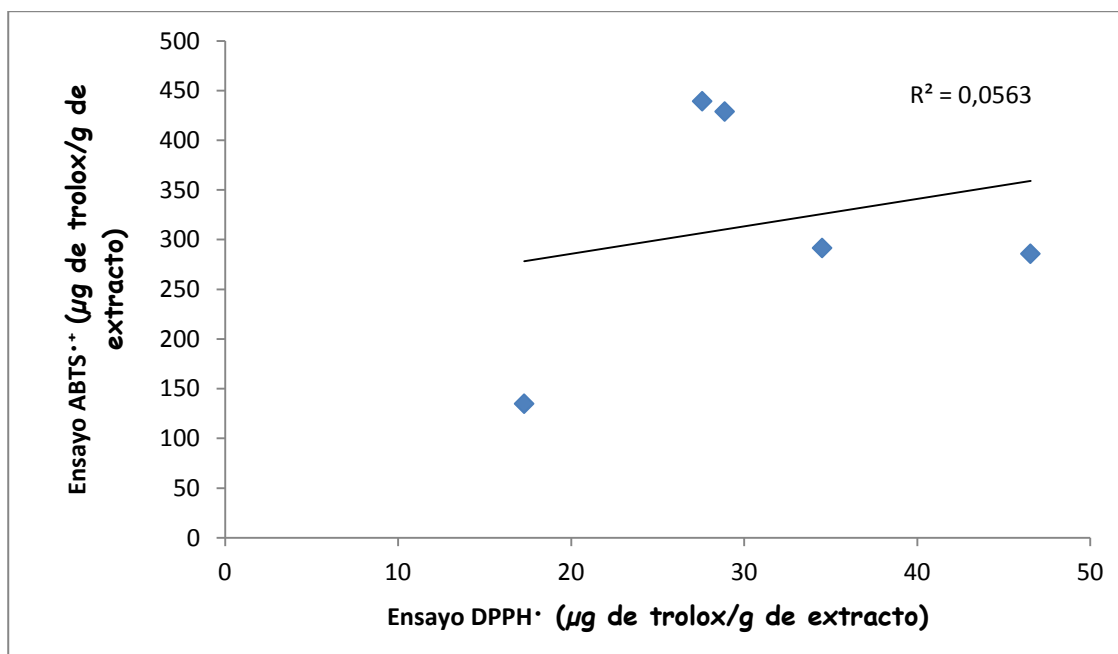
a. UTP 184

CONCENTRACIÓN	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		PROMEDIO %AA	DS
	ensayo 1	ensayo 2		
10 ppm	3,98	3,33	3,66	0,46
50 ppm	4,85	4,38	4,62	0,33
100 ppm	6,59	7,05	6,82	0,33
250 ppm	9,01	11,57	10,29	1,81
500 ppm	15,08	15,7	15,39	0,44

Anexo 7. Curva de calibración del trolox para el ensayo de ABTS^{•+}



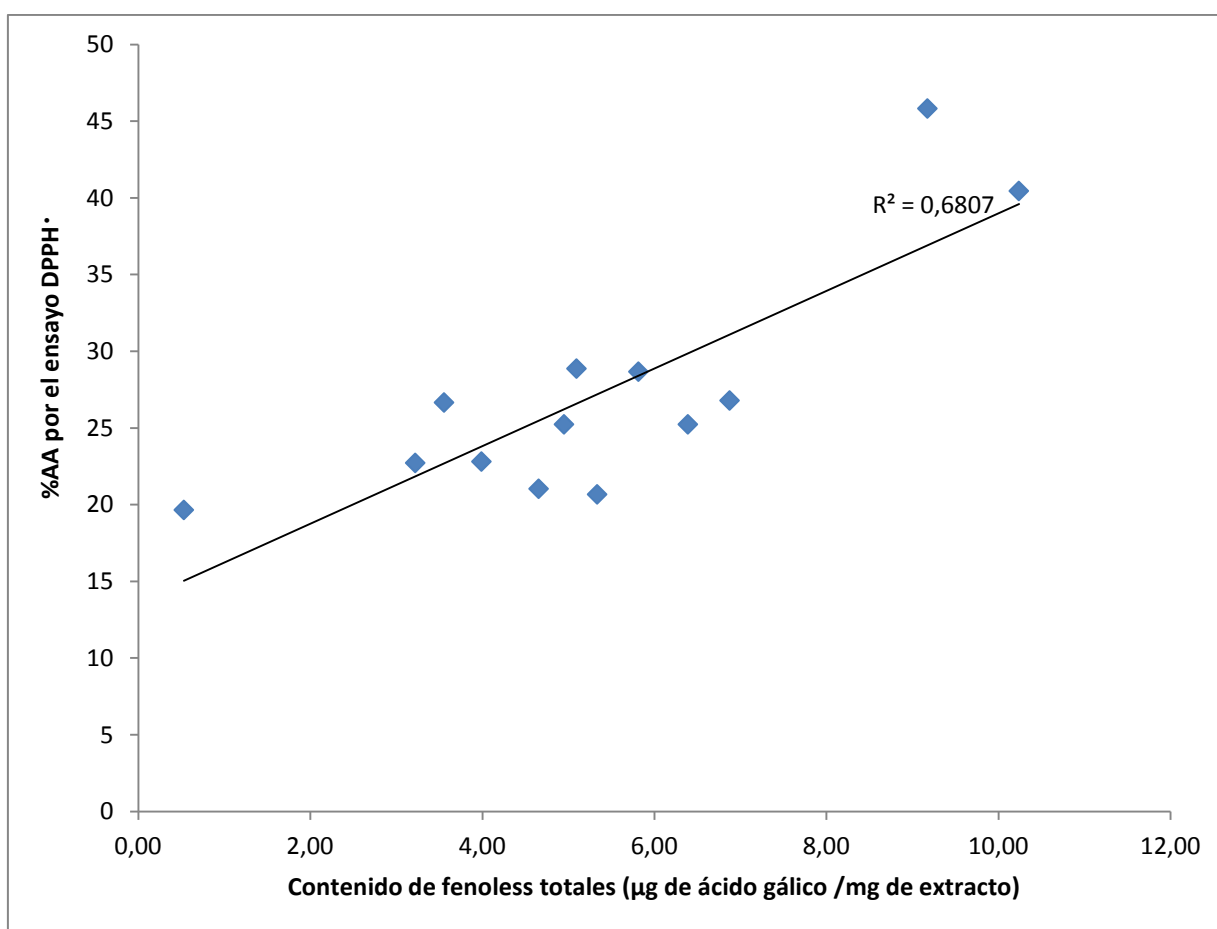
Anexo 8. Correlación entre los porcentajes de actividad antioxidante obtenido mediante en ensayo ABTS^{•+} y el ensayo DPPH[•] para los extractos de diclorometano.



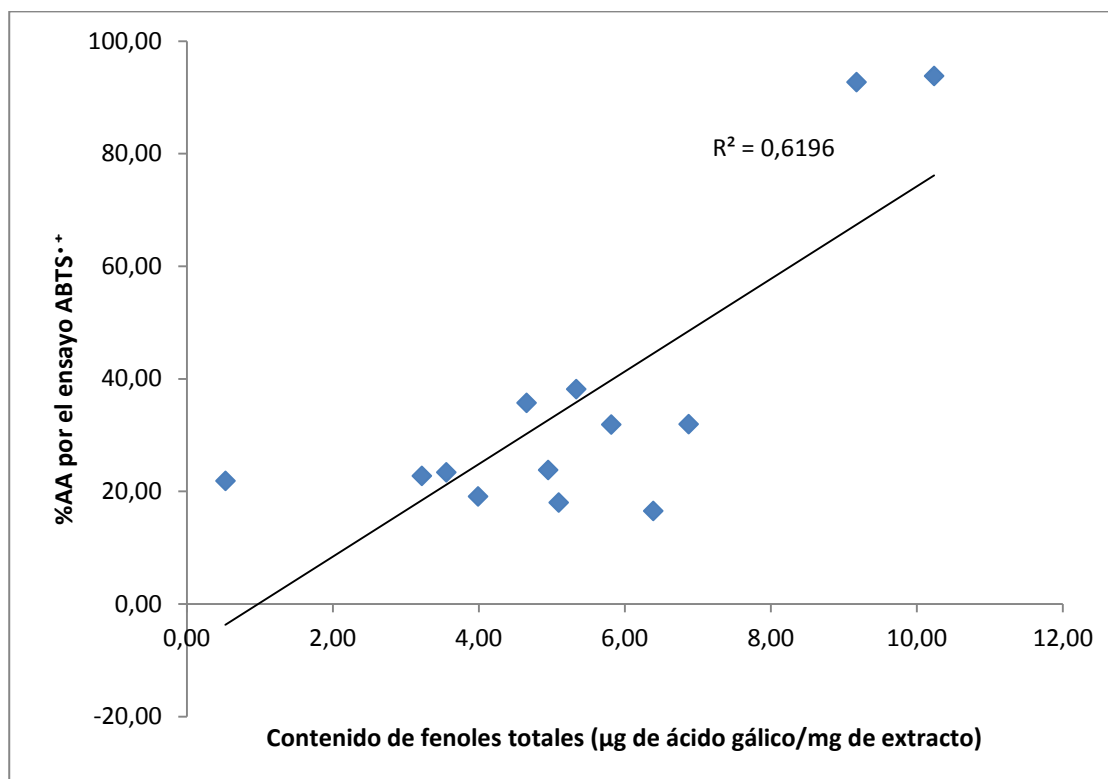
Anexo 9. Datos correspondientes a la construcción calibración del ácido gálico

Concentracion de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 760 nm
0	0,010
2	0,028
4	0,050
8	0,101
16	0,174

Anexo 10. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de metanol obtenida mediante el ensayo DPPH \cdot



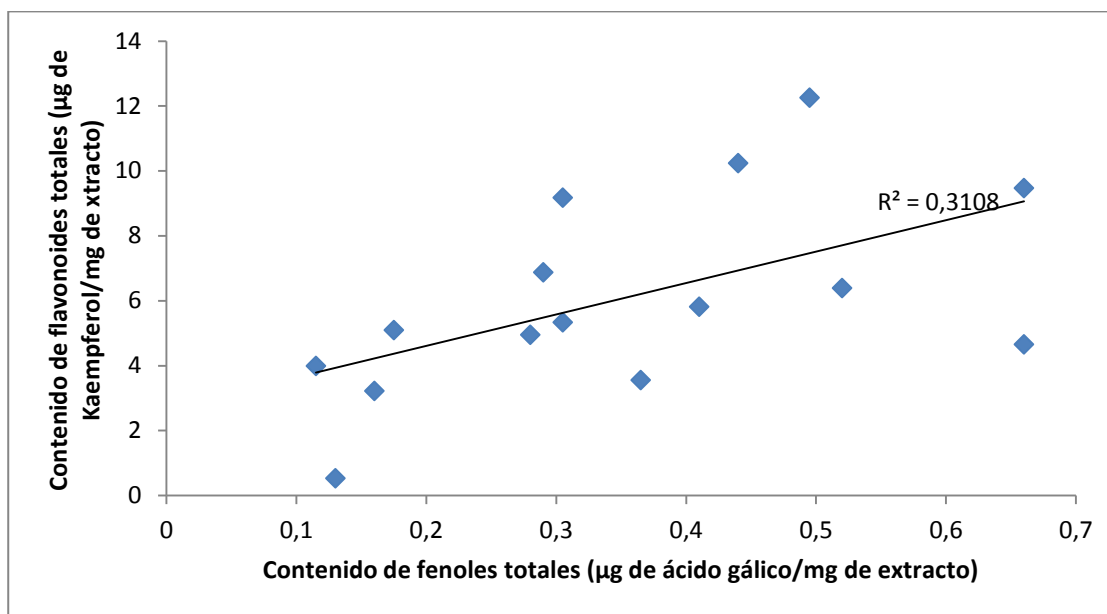
Anexo 11. Contenido de fenoles totales y su correlación con actividad antioxidante de los extractos de metanol obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+}



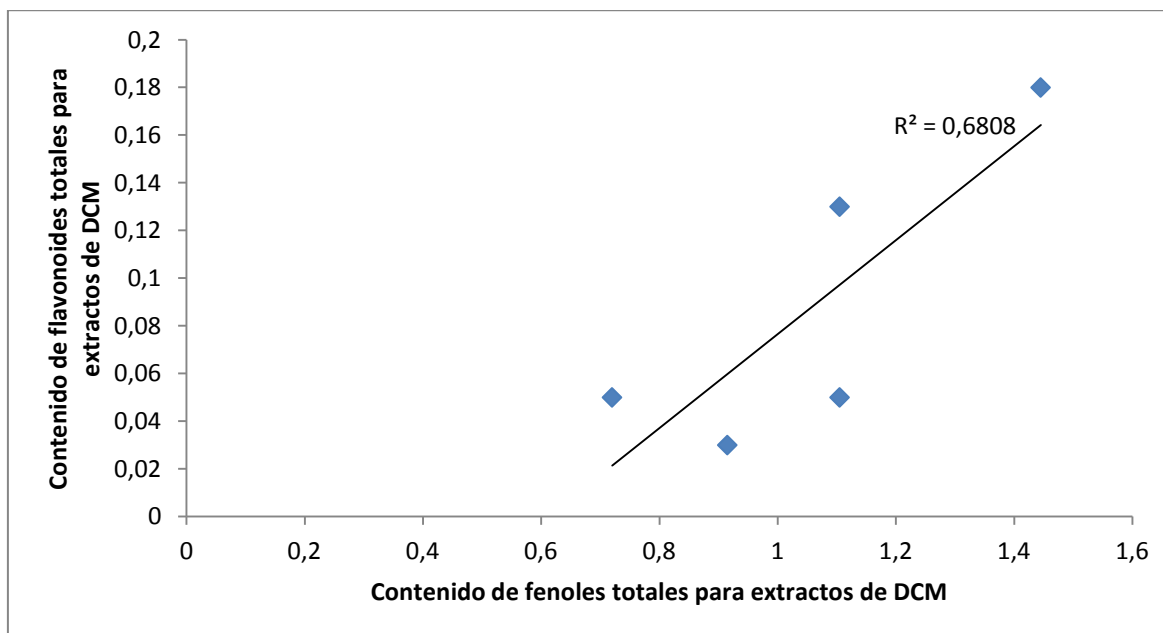
Anexo 12. Curva de Calibración del kaempferol.

Concentración Kaempferol (µg/mL)	Absorbancia 500 nm
0	0,007
0,05	0,011
0,1	0,014
0,2	0,024
0,4	0,043
0,8	0,083

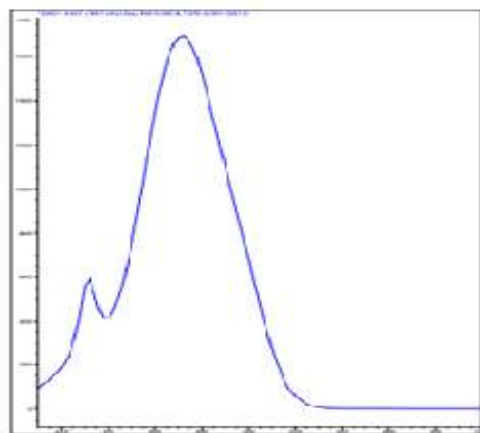
Anexo 13. Correlación entre el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales para los extractos de metanol.



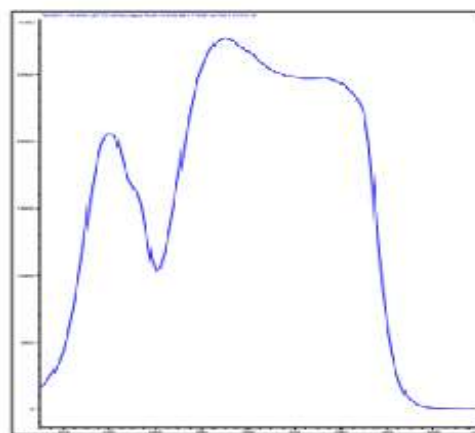
Anexo 14. Correlación entre el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales para los extractos de diclorometano.



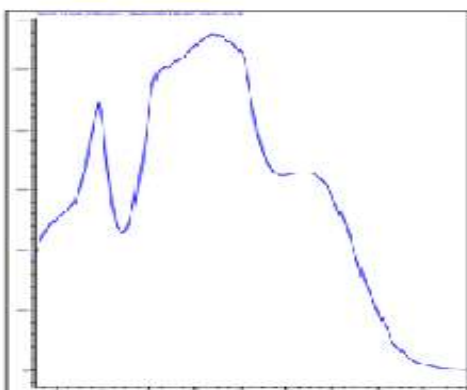
Anexo 15. Espectros UV de los estándares analizados por HPLC



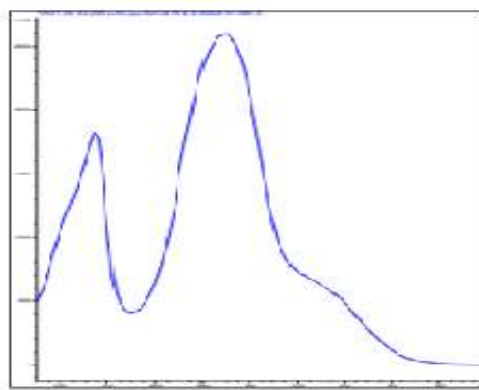
Acido gálico



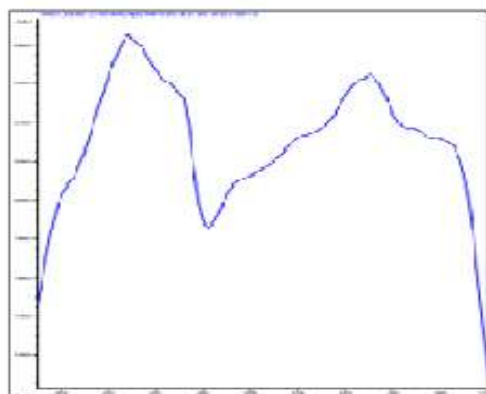
7-hidroxicumarina



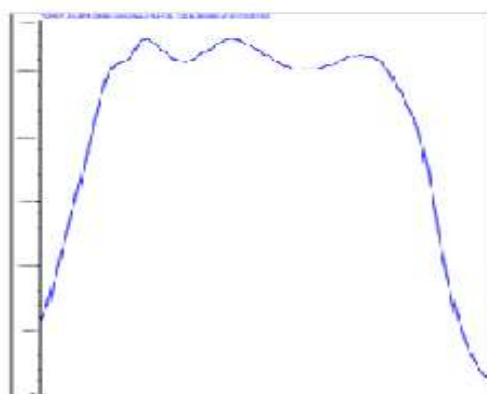
Hesperidina



Naringenina

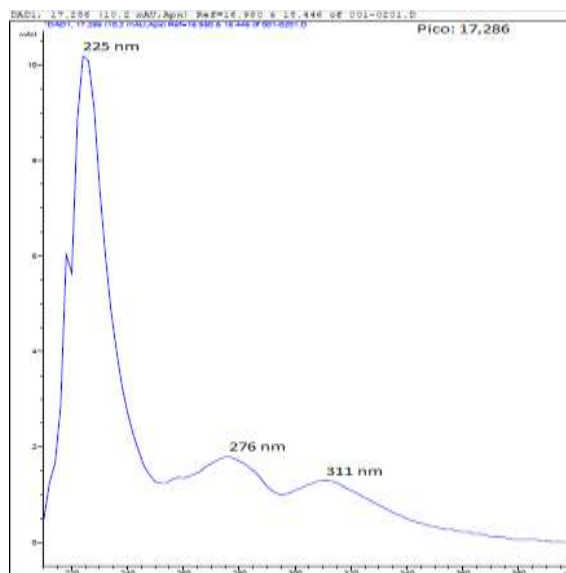
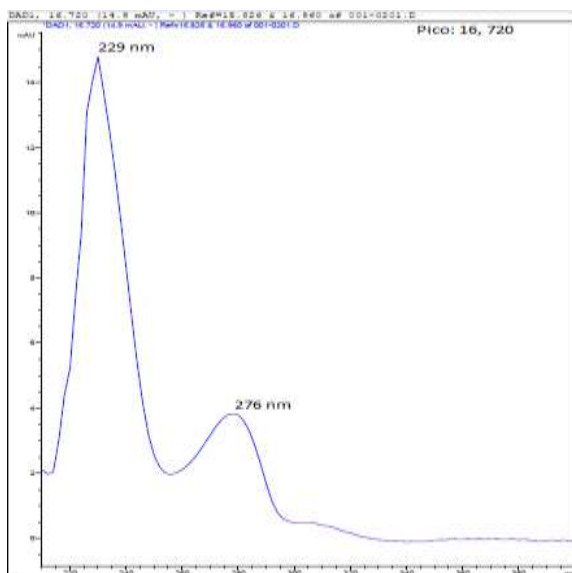
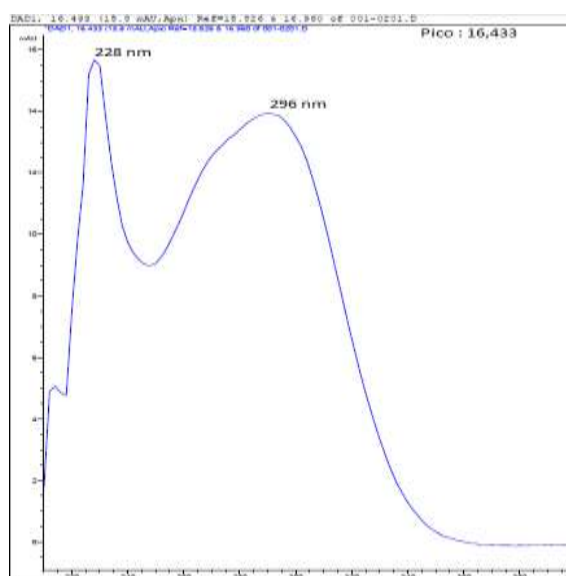
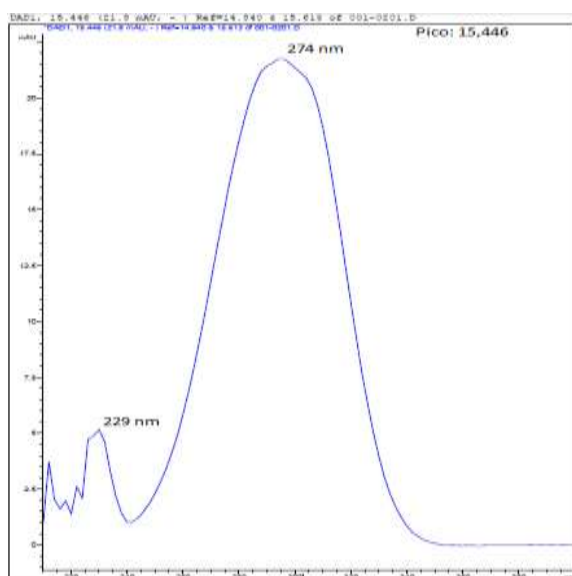


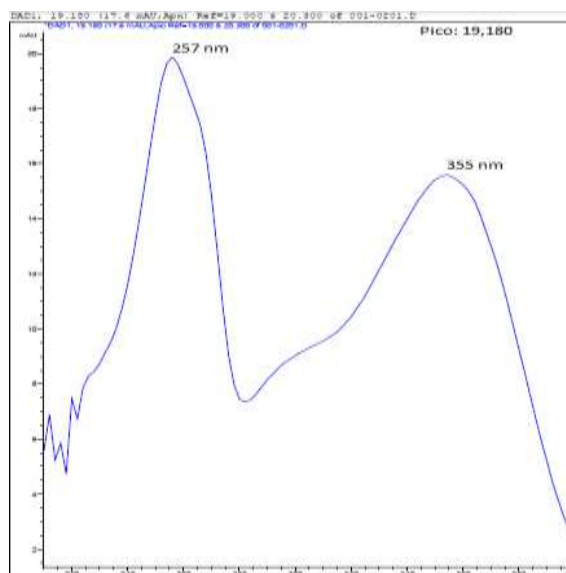
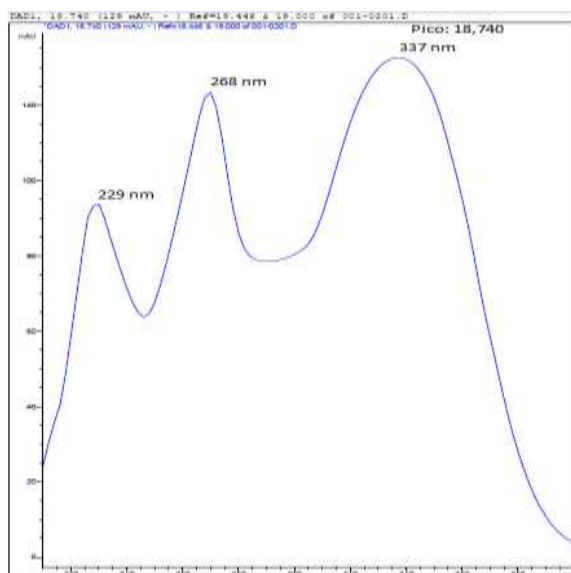
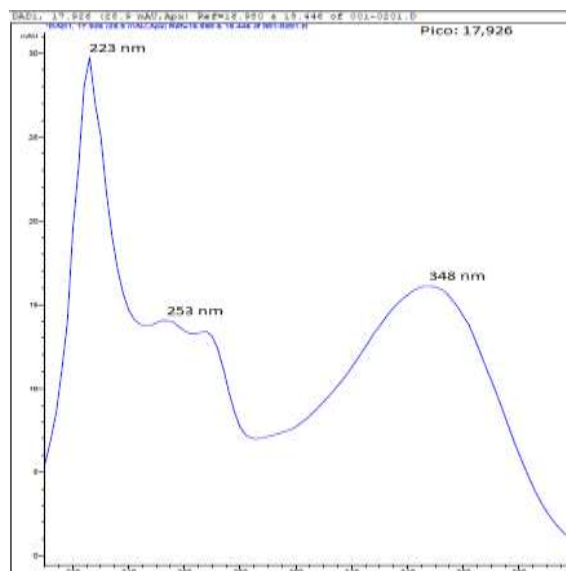
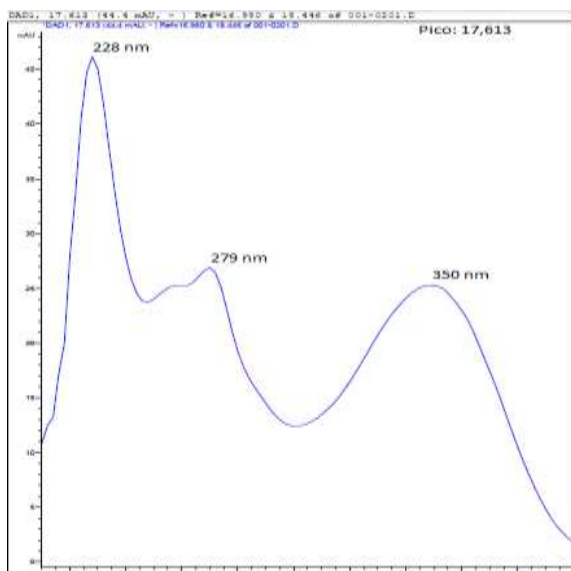
Kaempferol



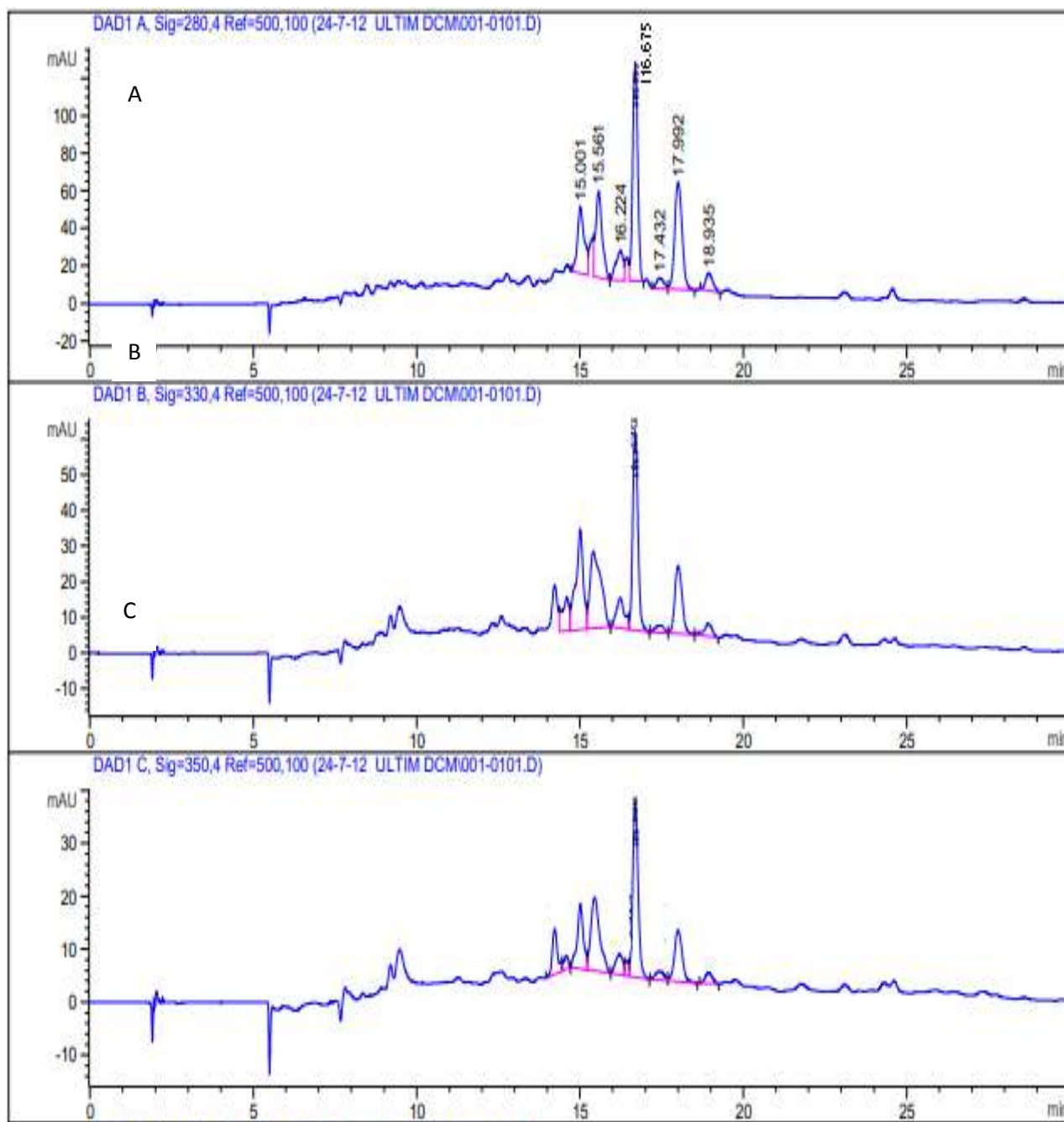
Apigenina

Anexo 16. Espectros UV del cromatograma del extracto *Clusia multiflora* (UTP 157) de metanol a longitud de onda de 280. Sistema de elución 1.

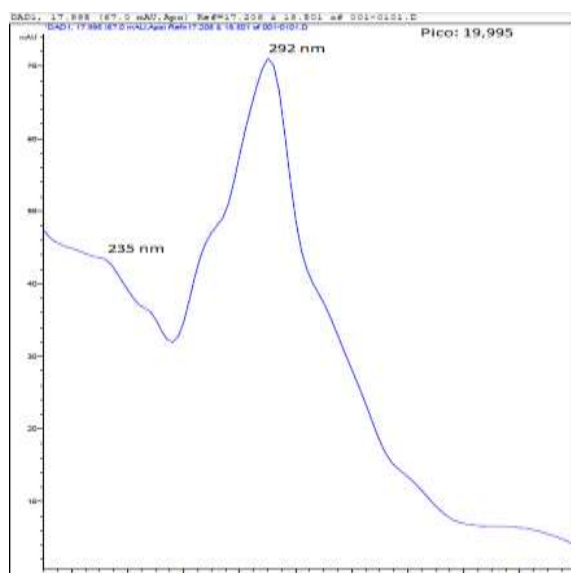
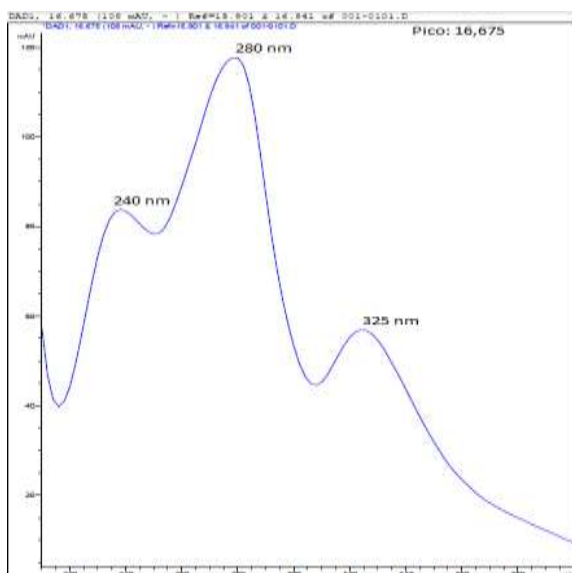
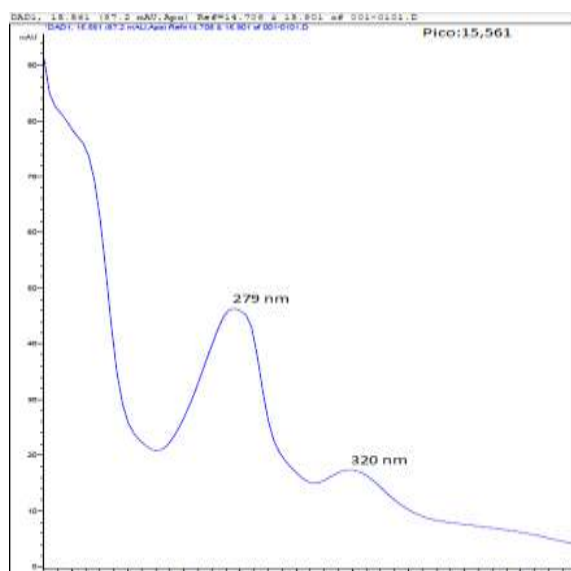
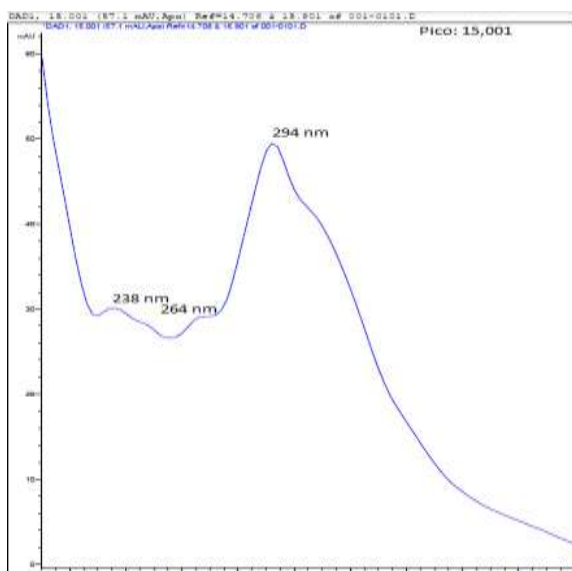


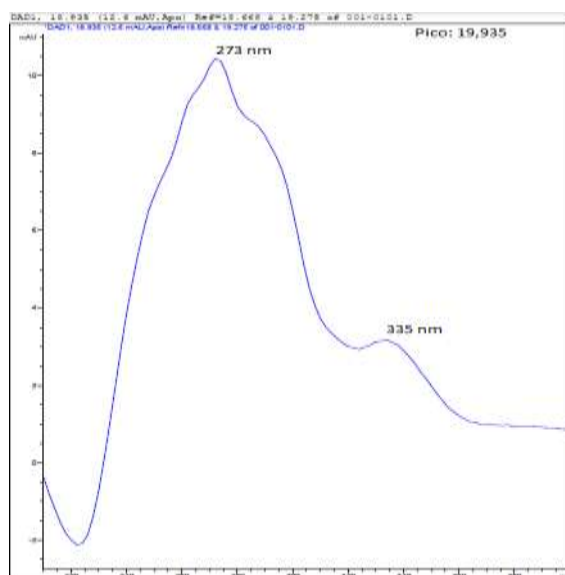


Anexo 17. Perfil cromatográfico por HPLC del extracto de diclorometano de *Clusia multiflora* (longitud de onda de 280, 330 y 350 nm).

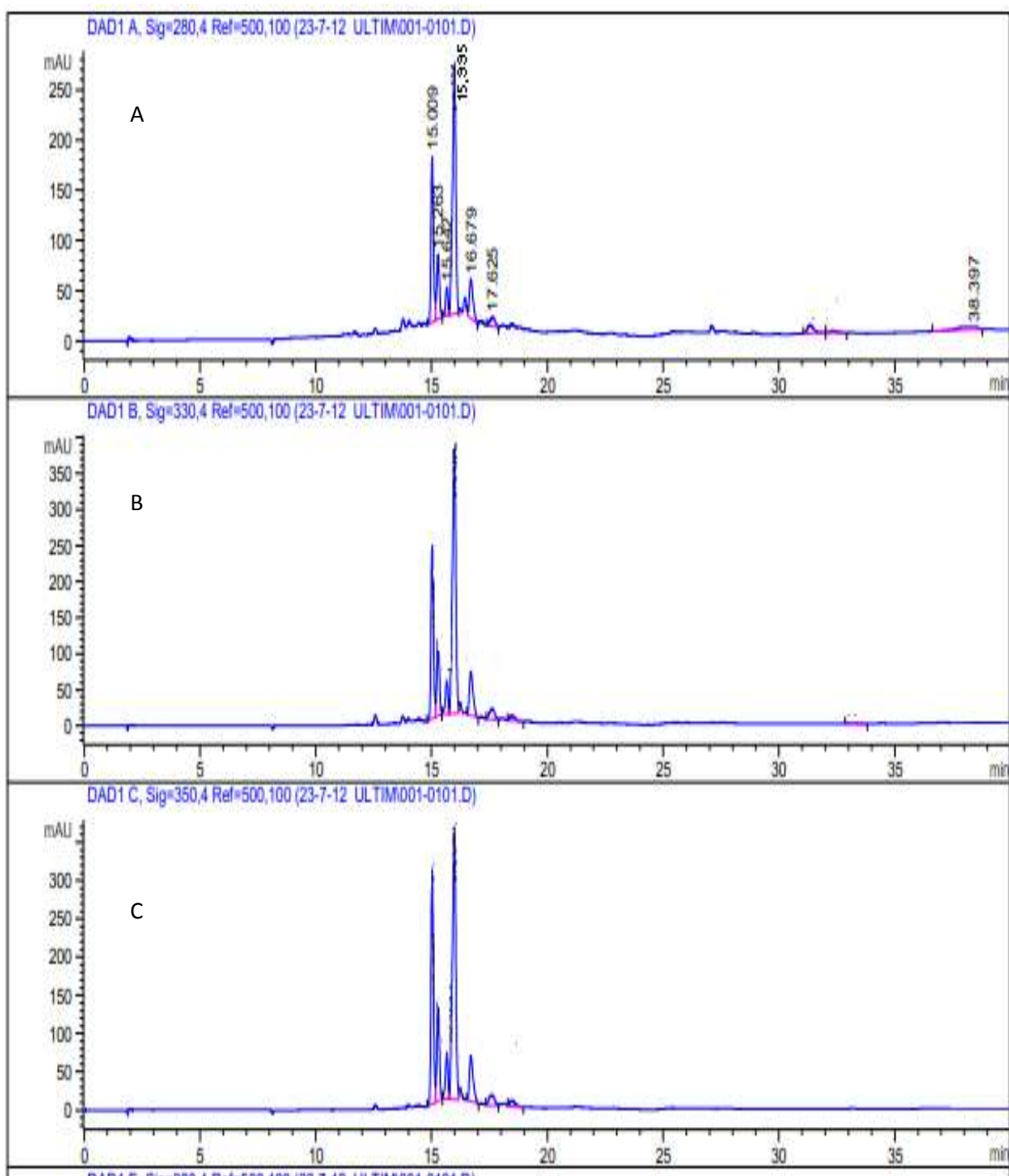


Anexo 18. Espectros UV del cromatograma del extracto *Clusia multiflora* (UTP 157) de diclorometano a longitud de onda de 280. Sistema de elución 2.

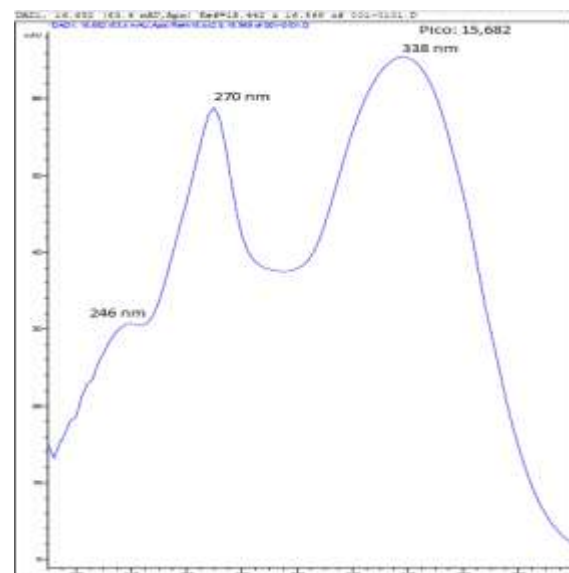
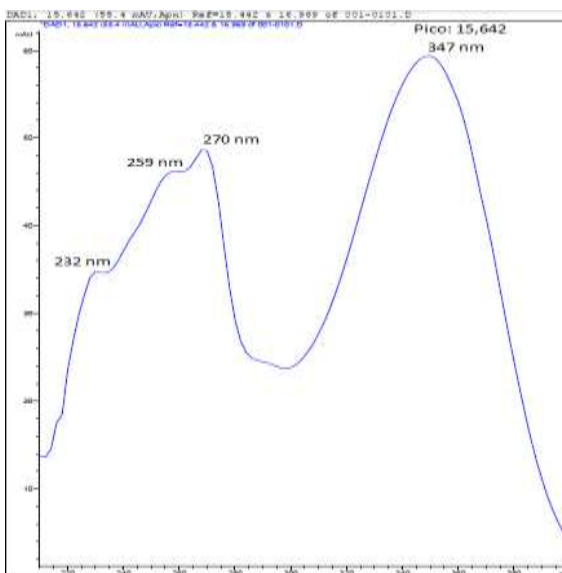
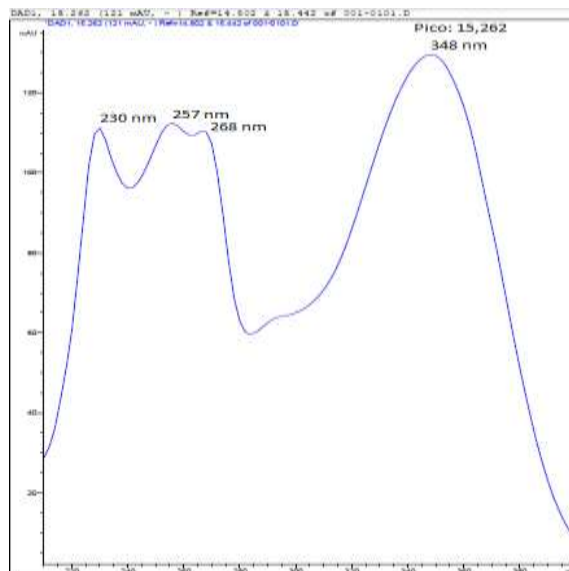
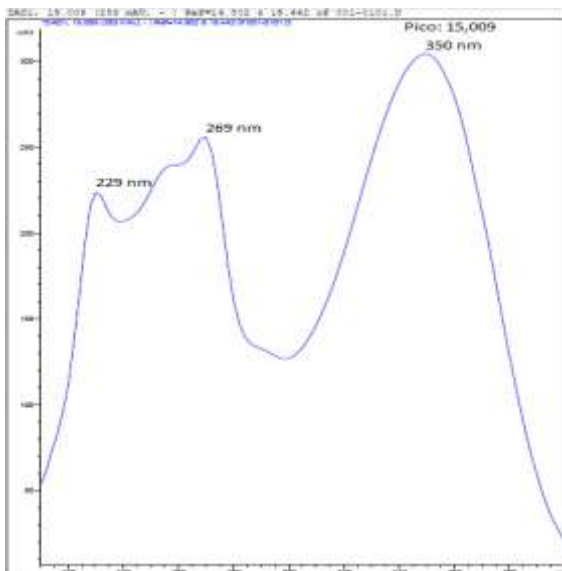


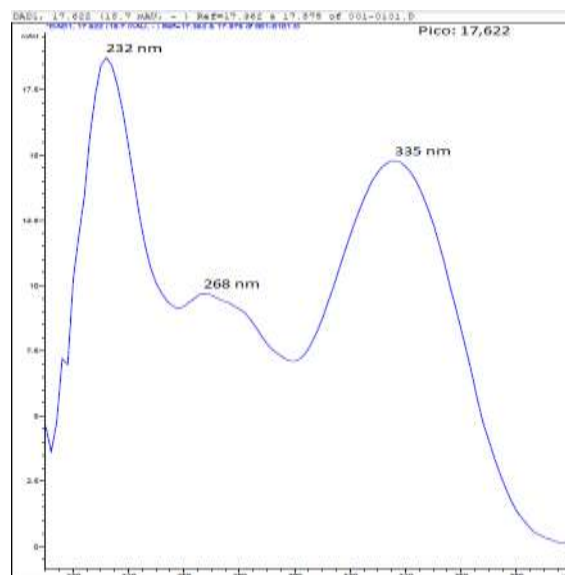
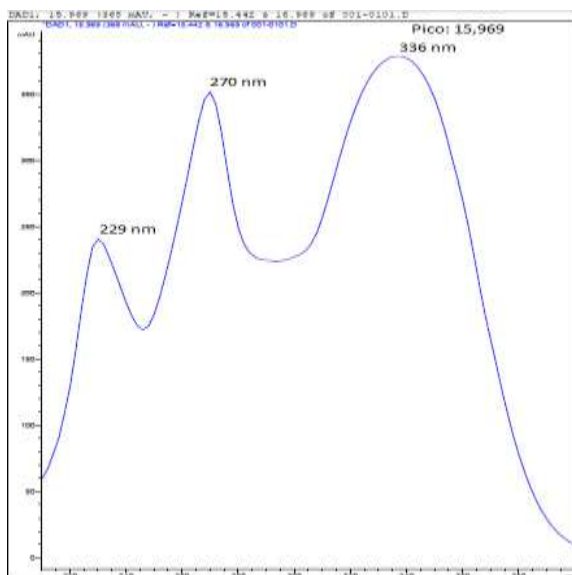


Anexo 19. Perfil cromatográfico por HPLC del extracto de metanol de *Tovomita Guianensis* (longitud de onda de 280, 330 y 350 nm).

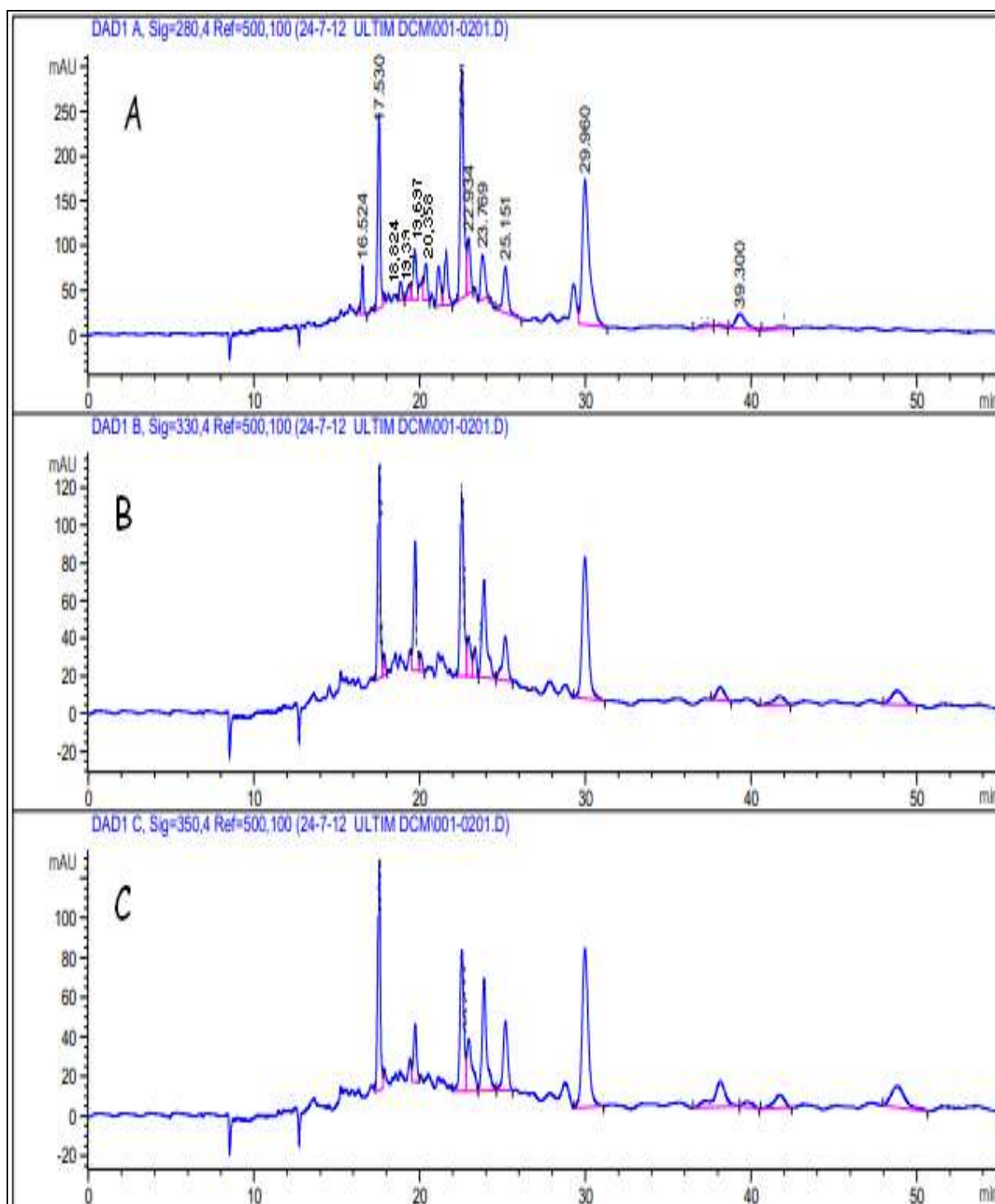


Anexo 20. Espectros UV del cromatograma del extracto *Tovomita Guianensis* (UTP 159) de metanol a longitud de onda de 280. Sistema de elución 1.

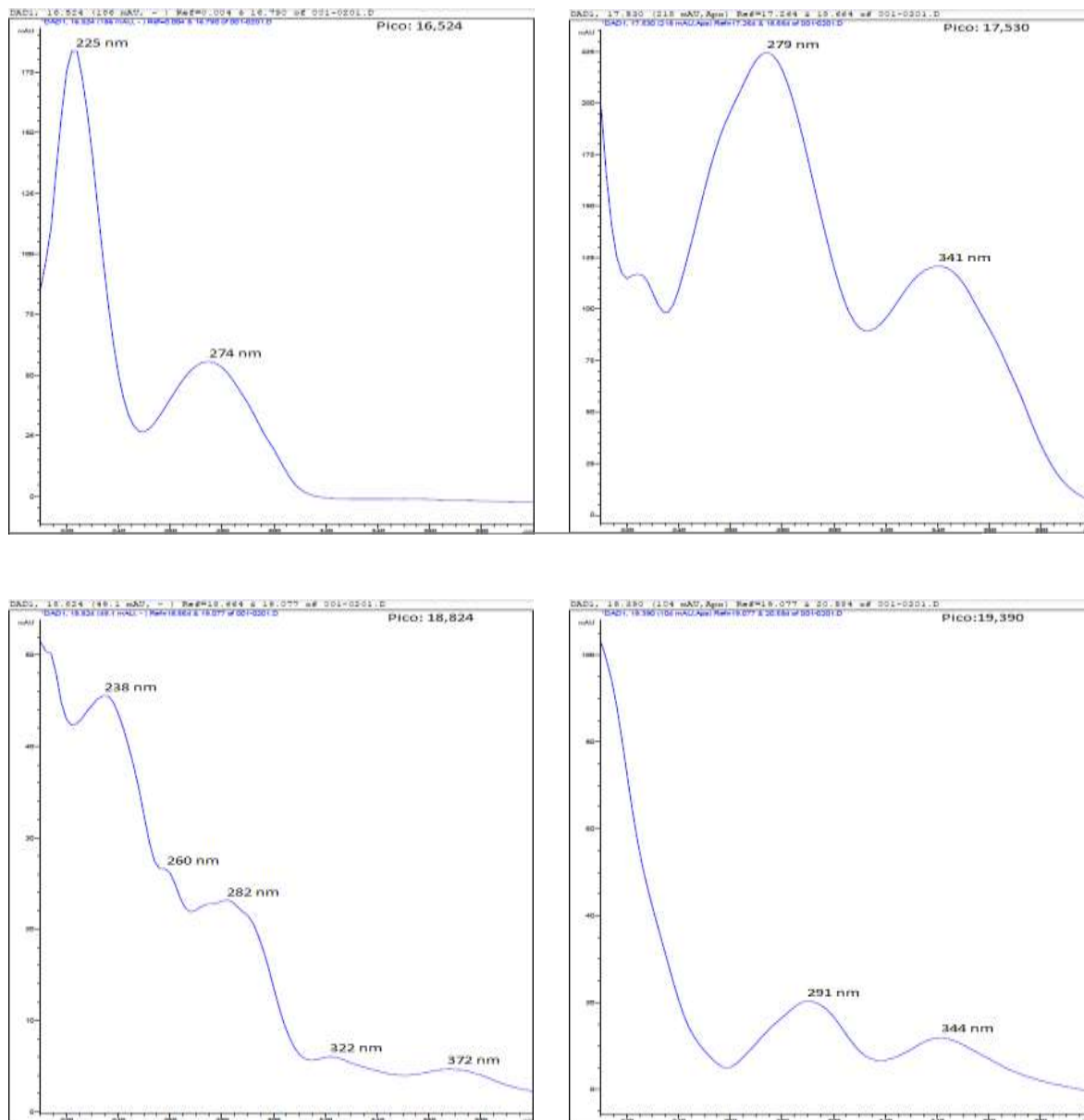


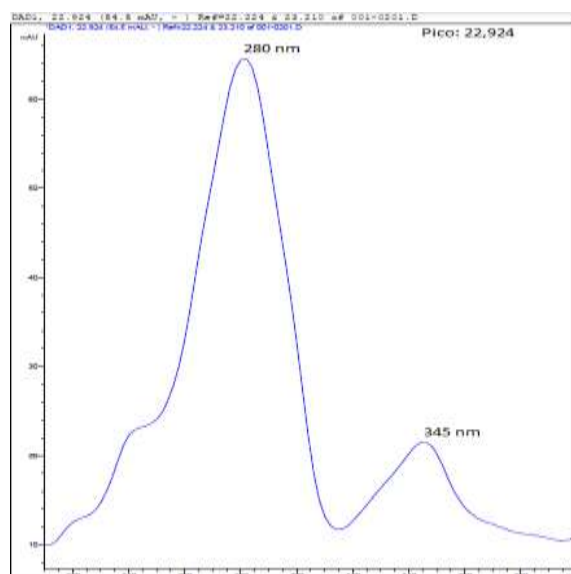
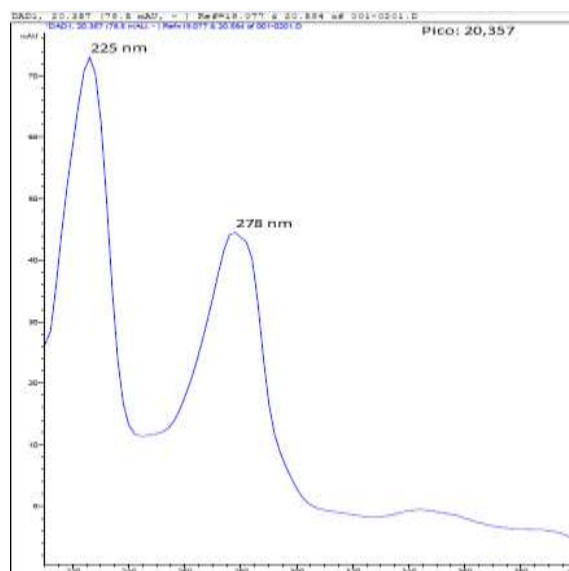
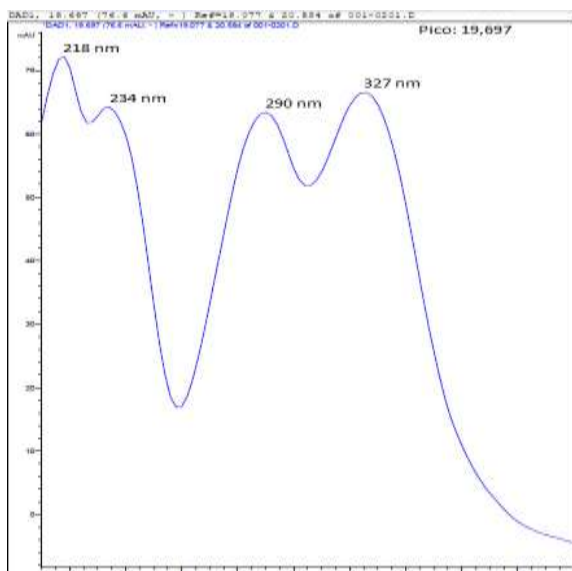


Anexo 21. Perfil cromatográfico por HPLC del extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (longitud de onda de 280, 330 y 350 nm).

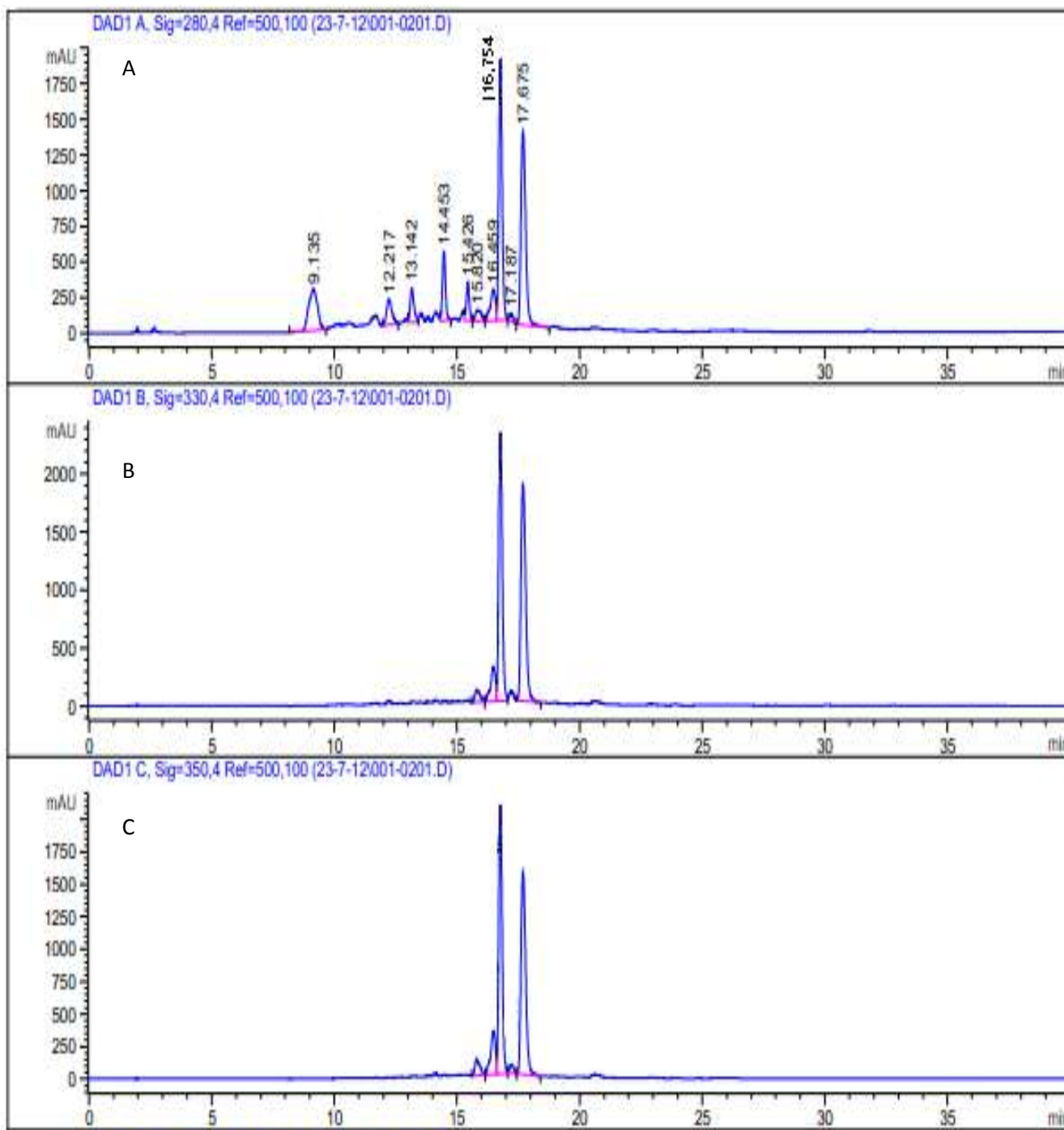


Anexo 22. Espectros UV del cromatograma del extracto *Tovomita Guianensis* (UTP 159) de diclorometano a longitud de onda de 280. Sistema de elución 3.





Anexo 23. Perfil cromatográfico por HPLC del extracto de metanol de *Topobea CF discolor* (longitud de onda de 280, 330 y 350 nm).



Anexo 24. Espectros UV del cromatograma del extracto *Topobea cf. discolor* (UTP 160) de diclorometano a longitud de onda de 280. Sistema de elución 1.

